

GIDA



THE JOURNAL OF FOOD

E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 42

SAYI / NUMBER : 1

YIL / YEAR : 2017

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

GIDA (Gıda Teknolojisi Derneği Yayını)
THE JOURNAL OF FOOD (Published by the Association of Food Technology; Turkey)
Cilt / Volume: 42 • Sayı / Number: 1 • 2017
İki ayda bir yayımlanır / Published bimonthly
E-ISSN 1309-6273, ISSN 1300-3070

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

<p>Editörler / Editors Halkman, A. Kadir <i>Ankara University, Turkey</i> Çakır, İbrahim Abant <i>Izzet Baysal University, Turkey</i> Erinç, Hakan Ömer <i>Halisdemir University, Turkey</i> Taban, Birce <i>Ankara University, Turkey</i> Özden, Özkan <i>Istanbul University, Turkey</i></p> <p>Yönetim Yeri Adres / Address Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey</p> <p>Tel: (+90) 0534 968 5994 • Faks: (+90) 312 317 8711 E-posta / E-mail: dergi@gidadernegi.org URL: http://www.gidadernegi.org</p> <p>Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli</p> <p>Hazırlayan / Prepared Onay Ofset Matbaacılık G.M.K. Bulvarı No: 108/1 Maltepe / Ankara Turkey Tel : (+90) 312 230 22 09 e-mail: onayofset@gmail.com</p> <p>Yayın Tarihi / Publication Date 15 02 2017</p>	<p>Danışma Kurulu / Advisory Board Alichanidis, Efstathios <i>Aristotle University of Thessaloniki, Greece</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> 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> Şanlıbaba, Pınar <i>Ankara University, Turkey</i> Üstünoğlu, Zeynep <i>Michigan State University, USA</i> Yetişemiyen, Atıla <i>Ankara University, Turkey</i></p>
---	---

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

Savran D, Halkman AK; Yoğurt fermantasyonu sırasında <i>Salmonella</i> Enteritidis'in farklı inokülasyon koşullarında canlı kalma durumunun araştırılması / <i>Investigation of survival of Salmonella Enteritidis during yoghurt fermentation at different inoculation levels</i>	1-7
Kankaya DA, Tuncer BÖ, Tuncer Y; Gıda kaynaklı enterokokların potansiyel risk faktörleri / <i>Potential risk factors of food originated Enterococci</i>	8-19
Alkaya GB, Erdoğan F, Ekiz Hİ; Kızılötesi uygulama ile yüzey dekontaminasyon prosesi sırasında yumurta kabuğu yüzey sıcaklığının kızılötesi termografi ile belirlenmesi / <i>Determination of surface temperature of shell-eggs by using infrared thermography during infrared surface decontamination process</i> .	20-26
Özen BÖ, Soyer A; Bitkisel ekstraktların dondurularak depolanan uskumru (<i>Scomber scombrus</i>) kıymasındaki kalite değişimlerine etkisi / <i>Effects of plant extracts on quality alteration in mackerel (Scomber scombrus) mince during frozen storage</i>	27-36
Çabuk H; <i>Liquid chromatographic determination of synthetic antioxidant content of some vegetable oils produced in Turkey</i> / Türkiye'de üretilen bazı bitkisel sıvı yağların sentetik antioksidan içeriklerinin sıvı kromatografisi ile belirlenmesi	37-42
Tuta S, Palazoğlu TK; <i>Effect of baking and frying methods on quality characteristics of potato chips</i> / Kızartma ve fırınlama yöntemlerinin patates cipslerinin kalite özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi . . .	43-49
Demirkesen İ; Farklı mumlarla oluşturulan oleojellerin reolojik ve tekstürel özellikleri / <i>Rheological and textural characteristics of oleogels formed by different waxes</i>	50-57
Saygılı D, Karagözlü C; Bakteriyofaj enkapsülasyonu ve potansiyel uygulamaları / <i>Bacteriophage encapsulation and potential applications</i>	58-66
Yeğin S; <i>Aureobasidium pullulans</i> ile ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerin belirlenmesi / <i>Determination of the bioprocess parameters effecting xylanase production by Aureobasidium pullulans</i>	67-75
Darıcı M, Cabaroğlu T; Türkiye'de farklı coğrafi yörelerde üretilen kalite Kalecik Karası kırmızı şaraplarının duyu tanımlayıcılarının belirlenmesi / <i>Determination of sensory descriptors of quality Kalecik Karası wines produced from different geographic regions in Turkey</i>	76-85
Darıcı M, Karaoğlu SY, Çelik ZD, Cabaroğlu T; Bornova Misketi şaraplarının duyu tanımlayıcılarının belirlenmesi / <i>Sensory properties of Bornova Muscat wines</i>	86-94
Sevindik O, Selli S; Üzüm çekirdek yağı eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri / <i>The extraction methods of grape seed oil</i>	95-103

Editörden,

Merhaba,

GIDA Dergisinde yeni bir dönem başladı. Artık, kâğıda basılı dergimiz olmayacak ancak elektronik ortamda yayıma devam ediyoruz. Ana sayfamız olan www.gidadernegi.org adresi üzerinden basılmış ve basılacak olan tüm makalelere ücretsiz ve şifresiz erişim mümkündür. www.trgidadergisi.org adresimizde sadece dergi vardır.

Yeni yayın politikamızda küçük değişiklikler yaptık. Bundan sonra kabul edilen her makale, sayı ve sayfa numarası olarak elektronik ortamda yayımlanacak. Nitekim baskıya hazır 10 makaleye de 2. sayı ve sayfa numarası verildi.

Önceki uygulamada İngilizce araştırma, Türkçe araştırma ve Türkçe derleme önceliğimize göre sayı tamamladığında sayfa numarası veriliyordu. Bu uygulamada kabul tarihine göre sayfa numarası verildiği için örneğin, aynı sayıdaki Türkçe derleme makalesi, İngilizce araştırma makalesinden daha önce yayımlanabilmektedir.

Yeni uygulamada dergi içinde bir diğer değişiklik, makalelerin sağ (tek) sayfa numarası ile başlama kuralımızın son bulmasıdır. TÜBİTAK dergileri dâhil pek çok dergide art arda gelen makaleler sağ ya da sol (çift) sayfa numarası ile başlamaktadır. Nitekim bu sayımızda yayımlanan 12 makalenin 6 adedi sol sayfa ile başlamaktadır. Devamında elektronik ortamda yayım yapmanın bir diğer avantajı şekil ve grafiklerin renkli olarak yayımlanabilmesidir.

3. Uluslararası Gıda Teknolojisi Kongresi (3rd International Congress on Food Technology) 10-12 Ekim 2018 tarihinde Kapadokya'nın merkezi olan Nevşehir'de yapılacaktır. Bu kongrenin web sayfası tamamlanmak üzeredir.

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. A. Kadir Halkman

A Message from the Editor-in-Chief

Hello,

A new era has started in FOOD Journal. We will no longer have published version of the journal, but we are continuing to print it in electronic form. It's possible to reach all articles which were published and will be printed, through our homepage www.gidadernegi.org with free of charge and unencrypted access. We only have journal at www.trgidadergisi.org.

We made minor changes in our new printing policy. From now on, every accepted article will be printed in electronic form with an issue number and a page number. As a matter of fact, the issue number: 2 and the page numbers were given to the 10 articles which had been ready for printing.

In the previous application, the page number was given when the issue was completed according to our editorial policy which is firstly research articles in English, then research articles in Turkish, and the latest is the review articles in Turkish. In this application, since the page number is given according to the date of acceptance of the manuscript, for example, the review article in Turkish can be printed before the research article in English in the same issue.

As another change in the journal, our rule of starting the article with the right (single) page number ends. Articles published in many journals, including TUBITAK journals, start with the right or left (double) page number. As a matter of fact, the 6 of 12 articles printed in this issue start on left pages. Another advantage of printing in electronic form is the printing of figures and graphics in color.

The 3rd International Congress on Food Technology will be held on October, 10-12 of the year 2018 in downtown of Nevşehir, that's Cappadocia. The website of this Congress has been under construction but this will be finished soon.

Best Regards,

Prof. A. Kadir Halkman

YOĞURT FERMANTASYONU SIRASINDA *SALMONELLA* ENTERITIDIS'İN FARKLI İNOKÜLASYON KOŞULLARINDA CANLI KALMA DURUMUNUN ARAŞTIRILMASI*

Derya Savran, A. Kadir Halkman**

Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 16.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 20.05.2016

Kabul tarihi / Accepted: 28.05.2016

Özet

Yoğurt düşük pH (4.2-4.5) içeriği ile mikrobiyolojik açıdan genellikle güvenilir gıda olarak düşünülmektedir. Diğer taraftan *Salmonella* spp. süt ürünleri tüketimi ile ilişkili hastalıkların en sık nedeni olarak gösterilmektedir. Bu çalışmada geleneksel yoğurt kültürü kullanılarak yapılan yoğurtlarda, *Salmonella* Enteritidis'in süte fermantasyon öncesi farklı inokülasyon düzeylerinde bulaştırılması durumunda fermantasyon süresince canlı kalma durumu araştırılmıştır. Sayım yapılan her aşamada pH ölçümü yapılmıştır. Fermantasyon sonunda *S. Enteritidis* sayısı yaklaşık 3; 5 ve 7 log KOB/mL düzeylerinde bulaşma durumları için sırasıyla 2.95; 4.93, 7.05 log KOB/g'dan 3.26; 5.55; 6.98 log KOB/g'a ulaşmıştır. Farklı inokülasyon koşullarında örneklerin pH değerleri arasında fark görülmemiş ($P>0.05$), fermantasyon süresince pH değeri 6.3'ten 4.5'e düşmüştür. Çalışma düşünülenin aksine, *Salmonella*'nın yoğurt fermantasyonu süresince düşük inokülasyon düzeyinde dahi canlılığını sürdürebilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Yoğurt, *Salmonella*, fermantasyon, canlı kalma

INVESTIGATION OF SURVIVAL OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS DURING YOGHURT FERMENTATION AT DIFFERENT INOCULATION LEVELS

Abstract

Yoghurt has generally been considered microbiologically safe as a consequence of low pH (4.2-4.5). On the other hand, *Salmonella* spp. is reported the most common cause of diseases associated with consumption of dairy products. In this study, survival of *Salmonella* Enteritidis at different inoculation levels during fermentation of yoghurt prepared using traditional yoghurt cultures was investigated. The pH of the samples was monitored when the enumeration procedures were carried out. At the end of the fermentation process, the counts of *S. Enteritidis* reached from 2.95; 4.93; 7.05 to 3.26; 5.55; 6.98 log CFU/g for the three initial inoculum levels (3; 5 and 7 log CFU/mL), respectively. The changes of pH values were similar for all experiments ($P>0.05$), and the pH dropped from 6.3 to 4.5 during the fermentation period. In contrast to common belief, the study showed that this pathogen can survive in milk fermentation process even at low contamination level.

Keywords: Yoghurt, *Salmonella*, fermentation, survival

* Bu çalışma Derya Savran'ın Doktora Tezinin bir bölümüdür / This paper is a part of Ph.D Thesis of Derya Savran

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ halkman@ankara.edu.tr, ☎ (+90) 312 203 3300 / 3625, 📠 (+90) 312 317 8711

GİRİŞ

Fermantasyon teknolojisi gıdaların muhafazasında kullanılan en eski teknolojilerden biridir. Fermantasyon sırasında oluşan bazı bileşikler fermente ürünlerin kendilerine özgü lezzetini ve besleyici değerini kazandırmakta, bazı bileşikler de pH'yı düşürerek ürünlerin mikroorganizma gelişimine karşı güvenilir hale gelmelerini sağlamaktadır (1).

Fermente bir ürün olan yoğurt, *Streptococcus thermophilus* (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) ve *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)'tan oluşan starter kültür ile laktik asit fermantasyonu sonucu elde edilen bir süt ürünüdür. Sahip olduğu besin değeri ve sağlık üzerine olumlu etkileri nedeni ile diyetle önemli bir yere sahiptir (2-4). Kullanılan starter kültürün orijinininden bağımsız olarak yoğurt üretimi sırasında düşen pH, aside duyarlı bakterilerin gelişimini önlemekte ve yoğurda antimikrobiyel özellik kazandırmaktadır (5). Bu bakımdan yoğurt, mikrobiyolojik açıdan genellikle güvenilir gıda olarak düşünülmektedir (6).

Bununla birlikte patojen bakteriler, yoğurdun asitli doğasına rağmen fermantasyon sırasında canlılıklarını sürdürebilirler (7, 8). 1993 yılında, ticari yoğurt tüketimi sonrası HUS (Hemolitik üremik sendrom) gelişimi gözlenmiş, nedeni ise *E. coli* O157:H7 olarak belirlenmiştir (9).

Diğer taraftan gıda kaynaklı hastalıklar, bütün dünyada en önemli halk sağlığı sorunları arasında gösterilmektedir. ABD dünyanın en güvenli gıda tedarikçilerinden birisi olmasına rağmen, ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), gıda kaynaklı olarak; her yıl 48 milyon insanın hastalandığını, 128 bin insanın hastaneye yatırıldığını ve 3 bin insanın yaşamını yitirdiğini açıklamıştır (10). Gıda kaynaklı hastalanmaların 9.4 milyonunun, hastaneye yatırılmalarının 55961'inin, ölümlerin 1351'inin gıda kaynaklı patojenler (virüs, bakteri, parazit vb.) nedeniyle olduğu belirtilmiştir (11).

Gıda kaynaklı hastalanmalara en çok neden patojenin, nörovirüs olduğu belirtilirken, hastaneye yatırılmalarına ve ölümlere en çok neden olan patojenin *Salmonella* spp. olduğu bildirilmiştir (11). Enfeksiyonlara neden olan *Salmonella* izolatları serotiplendirildiğinde ilk üç sırayı Enteritidis, Typhimurium ve Newport'un

oluşturduğu yine raporlarda belirtilenler arasındadır (12).

Salmonella aynı zamanda süt ürünleri tüketimi ile ilişkili hastalıkların en sık nedeni olarak gösterilmektedir. Bununla birlikte, süt ürünleri kaynaklı oluşan vakaların ne kadarının yoğurt ve diğer fermente süt ürünleri ile ilgili olduğuna yönelik ulaşılabilir bir veri yoktur (13).

Çiğ sütün mikrobiyel yükünün fazla olması, yetersiz ısıl işlem, hijyen eksikliği nedeniyle paketlenme sırasındaki ikincil bulaşma vb. nedenler, yoğurdun *Salmonella* içermesini mümkün kılmaktadır. Literatür bilgileri, yoğurdun *Salmonella* gelişimi için uygun ortam olmadığını belirtse de mikroorganizma; ürün türü, pH değeri, depolama sıcaklığı ve çevresel koşullara bağlı olarak son üründe canlılığını sürdürebilmektedir (13). Aynı zamanda yoğurt, FDA tarafından hazırlanan listede gıda savunması açısından zaf değerlendirilmesi yapılmaması gereken, yani tedarik sürecinde güvenlik açığı bulunan ürünler arasında gösterilmektedir (14).

Bu nedenle önemli gıda patojenlerinin neden olduğu hastalıkların önlenmesi için, bu patojenlerin gıda içindeki davranışlarının araştırılması gerekmektedir. Literatürde yoğurdun fermantasyonu ve depolaması sırasında patojen gelişimi ile ilgili pek çok çalışma yapılmış olsa da (6-8, 15-18) yoğurda *Salmonella* davranışının incelendiği çalışmalar oldukça sınırlıdır (13, 19, 20).

Bu çalışmada, Atatürk Orman Çiftliği (AOÇ) Çiftlik Köy Yoğurdu üretiminde kullanılan geleneksel starter kültüre karşı, patojen bir mikroorganizma olan *Salmonella* Enteritidis'in fermantasyon işlemi süresince farklı inokülasyon düzeylerinde (10^3 ; 10^5 ve 10^7 KOB/mL) canlı kalma durumunun araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve YÖNTEM

Süt tozu

Yoğurt yapımında kullanılan yağsız süt tozu ENKA A.Ş.'den (Konya) sağlanmıştır. Süt tozunun antibiyotiksiz olduğu sertifikalandırılmıştır.

Bakteri kültürleri

Çalışmada kullanılan geleneksel yoğurt kültürleri (*L. bulgaricus* ve *S. thermophilus*) daha önce Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi

Laboratuvarında izole edilmiş, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle tanısı yapılmış ve son olarak Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (MOBAM) 16S rDNA analizi ile tanı kesinleştirilmiştir. Bu bakteriler 2014 Ekim ayından itibaren Atatürk Orman Çiftliği (AOÇ) Süt Fabrikası tarafından üretilmekte olan "Köy Yoğurdu" ve "Evde Yoğurt Yapma" setinde kullanılmaktadır. Buzdolabı sıcaklığında (4 °C) saklanan stok kültürler 44 °C'ta bir gece aktifleştirildikten sonra kullanılmıştır. Aktifleştirme amacı ile *L. bulgaricus* için De Man, Rogosa ve Sharpe broth (MRS, Merck 1.10661, Germany), *S. thermophilus* için M17 broth (Merck 1.15029, Germany) kullanılmıştır (21).

S. Enteritidis (ATCC 13076), adı geçen laboratuvarın kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. *S. Enteritidis*, tryptic soy (CASO) broth (TSB, Merck 1.05459, Germany) besiyerinde 37 °C' ta bir gece aktifleştirildikten sonra kullanılmıştır (21).

Yoğurt yapımı ve *Salmonella* inokülasyonu

Yoğurt yapımında kullanılacak süt, süt tozu kullanılarak hazırlanmıştır (% 10 m/v). Hazırlanan 400 mL süt otoklavda sterilize edilmiştir (115 °C'ta 10 dk). Sütün sıcaklığı 43-44 °C'a ulaştığında aseptik koşullarda 4 mL (% 1) *L. bulgaricus*, 4 mL (% 1) *S. thermophilus* ilave edilmiştir. Eş zamanlı olarak başlangıç inokülasyon düzeyi 10^3 , 10^5 ve 10^7 KOB/mL olacak şekilde *S. Enteritidis* ilavesi gerçekleştirilmiştir. Ön denemeler dikkate alınarak her üç bakterinin de (*L. bulgaricus*, *S. thermophilus* ve *S. Enteritidis*) bir gece aktifleştirilmiş kültüründeki mikroorganizma sayısının yaklaşık 10^9 KOB/mL olduğu kabul edilmiştir. Buna göre 400 mL süt ortamına fermantasyon öncesi yaklaşık 10^7 KOB/mL *L. bulgaricus*, 10^7 KOB/mL *S. thermophilus* ve ayrı ayrı 10^3 , 10^5 ve 10^7 KOB/mL sayıda *S. Enteritidis* inoküle edilmiştir. Manyetik karıştırıcı kullanılarak yeteri kadar karıştırılan süt, yaklaşık 40'ar mL olacak şekilde 100 mL'lik kaplara dağıtılmış ve istenilen asitlik düzeyine ulaşmaya kadar (4.5 pH - 4.5 sa) 44 °C'taki inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Her bir deneme setine (10^3 , 10^5 ve 10^7 KOB/mL düzeyinde *S. Enteritidis* inokülasyonu) ait deneyler farklı zamanlarda yapılmış ve çalışma 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Mikrobiyolojik analizler

S. Enteritidis sayısı fermantasyon süresince başlangıçtan (0. sa) itibaren 30 dk aralıklarla belirlenmiştir. Mikrobiyolojik analiz öncesi örnekler yeterince karıştırılmış ve homojen hale gelmeleri sağlanmıştır. Sonrasında aseptik koşullarda 5 g örnek alınıp 45 mL maximum recovery diluent (MRD, Merck 1.12535, Germany) içeren dilüsyon sıvısına aktararak 10^{-1} lik dilüsyon elde edilmiştir (Mikrobiyolojik analizlerden geri kalan örnekler pH ölçümü için kullanılmıştır). 10^{-1} lik dilüsyondan 1 mL alınıp 9 mL MRD içeren dilüsyon sıvısına aktararak ve benzer işlem sonraki dilüsyonlar için de devam ettirilerek seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Başlangıç *S. Enteritidis* inokülasyon düzeyine (10^3 ; 10^5 ve 10^7 KOB/mL) bağlı olarak seyreltmelere devam edilmiştir. Ardışık iki dilüsyon ile çalışılmıştır.

S. Enteritidis için yayma plak yöntemi kullanılarak, xylose lysine deoxycholate agar (XLD, Merck 1.05287, Germany) besiyeri içeren Petri kaplarına 0.1 mL örnek aktararak ekim yapılmış ve Petri kapları 37 °C'taki inkübatörde 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Sayım için her dilüsyondan 2 Petri kabına paralel ekim yapılmıştır. Bakteri sayısı standart sayım yöntemine göre hesaplanmış, sonuçlar log KOB/g cinsinden ifade edilmiştir.

pH ölçümü

Sayım yapılan her aşamada örneklerin pH'ları ölçülmüştür. Bu işlem pH metre (InoLab pH level 2) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanım öncesi pH metre, pH 4 ve pH 7 tampon çözeltileri kullanılarak kalibre edilmiştir.

İstatistiksel analiz

S. Enteritidis'in süte farklı inokülasyon düzeylerinde (10^3 ; 10^5 ve 10^7 KOB/mL) ilave edilmesi durumlarında, yoğurt örneklerinin pH davranışında farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi ile belirlenmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS yazılımı (versiyon 11.5) kullanılmıştır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Yoğurt genellikle düşük pH içeriği ile doğası gereği mikrobiyolojik olarak güvenli gıda olarak düşünülür (6). Bununla birlikte fermente süt

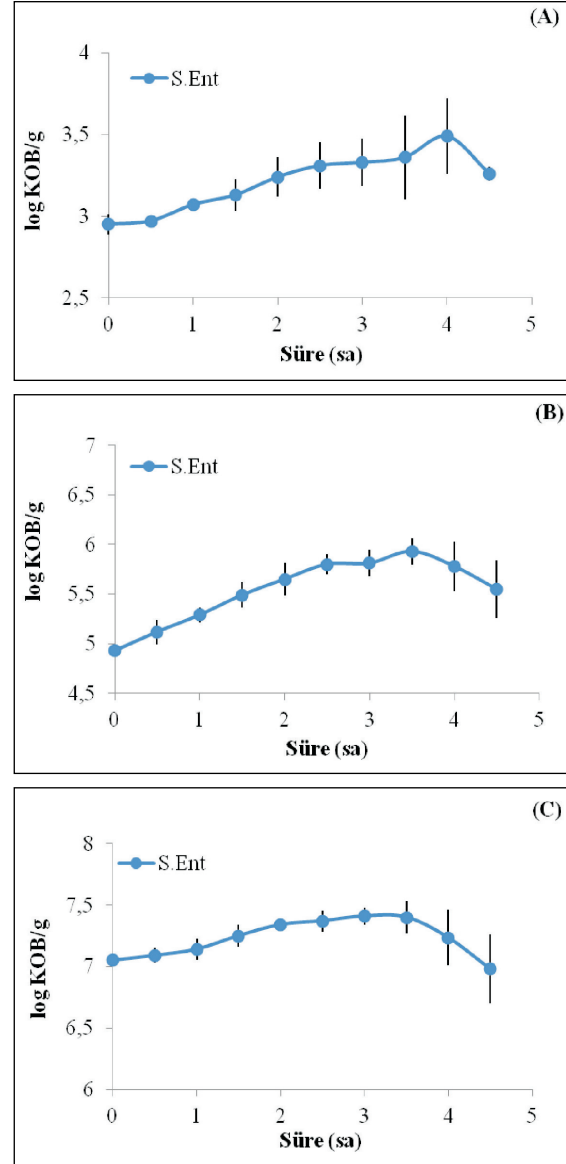
ürünleri üretimi sırasında yeterli hijyenik koşullar sağlanmazsa patojen bakteriler bir şekilde üretime karışabilir (22) ve laktik asit bakterileri tarafından geliştirilen asitlik ve oluşan pH düşüşüne rağmen gelişip canlılıklarını sürdürebilirler (7, 13).

Çalışmada *S. Enteritidis*'in fermantasyon öncesi süte farklı düzeylerde inoküle edilmesi ile fermantasyon süresince davranışı izlenmiştir. Fermantasyon süresince devam eden pH'daki azalmanın *S. Enteritidis*'in gelişimini durdurmada etkili olmadığı görülmüştür. *S. Enteritidis* sayısı, yoğurt bakterilerinin varlığına ve azalan pH'ya rağmen belli bir noktaya kadar artış göstermiş ve fermantasyonun son aşamasında hafif bir azalma göstermiştir. Fermantasyon sonunda *S. Enteritidis* sayısı, yaklaşık 3; 5 ve 7 KOB/mL bulaşma düzeyi için sırasıyla 2.95; 4.93; 7.05 log KOB/g değerlerinden 3.26; 5.55; 6.98 log KOB/g değerlerine ulaşmıştır. *S. Enteritidis* davranışı Şekil 1'de verilmiştir.

Fermantasyon süresince sayım yapılan her aşamada örneklerin pH değerleri ölçülmüştür. pH değişimi, *S. Enteritidis*'in farklı inokülasyon düzeylerinde yürütüldüğü tüm deneyler için benzer eğilimde devam etmiş, örneklerin pH'ları bakımından istatistiksel açıdan fark görülmemiştir ($P>0.05$). Fermantasyon boyunca pH değeri 6.3'ten 4.5'e düşmüştür (Şekil 2).

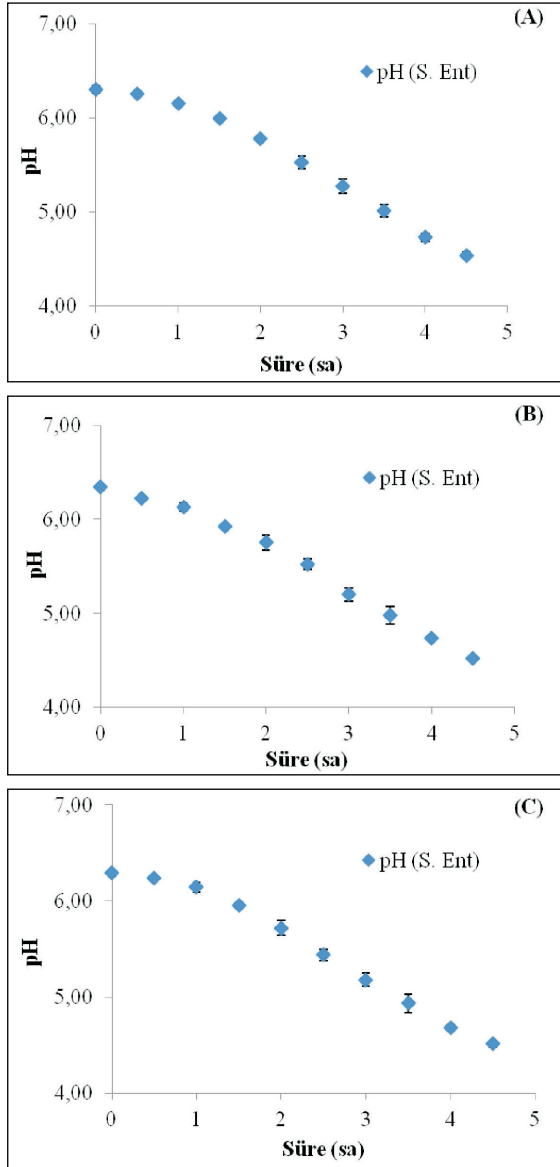
Bu süre zarfında pH değişimi ve *S. Enteritidis* davranışı ilişkilendirildiğinde; *S. Enteritidis* sayısının her üç inokülasyon düzeyindeki denemelerde yaklaşık 5.5 pH dolaylarına kadar artış gösterdiği sonrasında bir süre devam eden durgun fazdan sonra azalma eğilimini fermantasyon aşamalarının sonuna doğru yaklaşık ≤ 4.7 pH dolaylarında gösterdiği görülmüştür (Şekil 1-2). *Salmonella* üzerine sınırlı sayıda çalışma olsa da (23) patojen bakterilerin yoğurdun fermantasyonu sırasındaki canlı kalma durumu birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Çalışmalar yoğurdun fermantasyonu sırasındaki pH'nın patojen bakterilerin (*Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7) canlı kalmalarına izin verdiğini ve fermantasyonun sonunda, kullanılan yoğurt kültürlerinin orijinlerinden bağımsız (5), son pH değerine bağlı olarak mikroorganizma sayısında sadece hafif bir azalmanın olduğunu belirtmişlerdir (7, 8). Diğer taraftan laktik asit bakterileri tarafından üretilen, antimikrobiyel özellik gösteren bakteriyosinler, hidrojen peroksit,

etanol, diasetil gibi bileşikler de fermente ürünlerde patojen gelişimi üzerine etki edebilmektedir (24). Bir başka çalışma süte laktik asit bakterisi ilave edilmediği durumda patojenlerin gelişmeye devam ettiklerini, laktik asit bakterisi ilave edilmesi durumunda ise aynı süre içinde fermantasyon



Şekil 1. *S. Enteritidis*'in yoğurdun fermantasyonu sırasında farklı inokülasyon düzeylerindeki (3 (A), 5 (B), ve 7 (C) log KOB/mL) davranışı. Barlar ortalama *S. Enteritidis* sayısının standart sapmasını göstermektedir, S. Ent: *S. Enteritidis* sayısı

Figure 1. The behaviour of *Salmonella Enteritidis* during fermentation of yoghurt at different contamination levels (3 (A), 5 (B), and 7 (C) log CFU/mL). Bars show the standard deviations of the average *S. Enteritidis* viable cell counts. S. Ent: *S. Enteritidis* counts



Şekil 2. Yoğurt örneklerinin *S. Enteritidis*'in farklı inokülasyon düzeylerinde (3 (A), 5 (B), ve 7 (C) log KOB/mL) ilave edildiği durumlarda fermantasyon süresince ortalama pH değişimleri. Barlar ortalama pH değerlerinin standart sapmasını göstermektedir

Figure 2. The changes of average pH values of yogurt samples at different contamination levels (3 (A), 5 (B), and 7(C) log CFU/mL) of *S. Enteritidis* during fermentation. Bars show the standard deviations of the average pH values.

prosesine bağlı olarak belli bir gelişmenin ardından fermantasyonun sonunda mikroorganizma sayısında hafif bir azalmanın olduğunu göstermiştir (25). Bu çalışma, yoğurdun fermantasyonu sırasındaki patojen davranışı bakımından önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Diğer taraftan çalışma, *S. Enteritidis*'in yoğurdun fermantasyon koşullarında (sıcaklık (44 °C), pH (6.3-4.5) vd.) gelişebileceğini göstermiştir. Bu durum *Salmonella* spp.'nin, ≤ 54 °C ve 3 pH gibi optimum gelişme aralıklarının dışında kalan ekstrem çevresel koşullara adapte olabilmesi (26) ve diğer çevresel faktörlerin (gıda matrisinin kompleks yapısı) etkisi ile açıklanabilir. Ayrıca yapılan çalışmalar *Salmonella* suşlarının 44 °C'ta düşük sıcaklıklara oranla (15-35 °C) sıcaklığa daha toleranslı olduğu yönündedir (27).

Yoğurdun depolama başlangıcında *S. Enteritidis* bulaşması sonrası, farklı sıcaklıklarda depolama işlemi süresince canlılığını devam ettiriyor olması (13) gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından, *Salmonella*'nın depolama öncesi fermantasyon aşamasında bulaşmış olması durumundaki davranışının incelenmesini gerektirmektedir.

Çalışma, yoğurdun *Salmonella*'nın gelişimi için uygun ortam olmadığı düşüncesinin aksine mikroorganizmanın fermantasyon süresince düşük inokülasyon düzeyinde dahi gelişmesi/ canlılığını sürdürebilmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu durum gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından, yoğurt üretimi sırasında doğru üretim uygulamalarının önemine dikkat çekmektedir.

Ayrıca literatür taramasında, yoğurdun fermantasyon ve depolama aşamalarında patojen gelişimini inceleyen birçok çalışmaya rastlanmakla birlikte, *Salmonella*'nın gelişimini inceleyen çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmüştür. Bu nedenle elde edilen bu bulgular, literatüre konu ile ilgili katkı sağlamanın yanı sıra gıda ortamında mikroorganizma davranışlarının matematiksel modellerle tahmin edilmesini konu edinen prediktif mikrobiyoloji çalışmalarında, risk yöneticileri tarafından kantitatif risk değerlendirmelerinde kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Derya Savran'ın TÜBİTAK 2214-a Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu ile desteklediği projenin (1059B141500410) bir bölümünü oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Kalui CM, Mathara JM, Kutima PM. 2010. Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods - a review. *Afr J Biotechnol*, 9 (17): 2490-2498.
2. Madhu, Shiva Prakash, M, Neetu. 2013. Yoghurt is excellent vehicle for traveling probiotics to public health. *Int J Food Nutr Sci*, 2 (1): 126-137.
3. Hrnjez D, Vastag Z, Milanovic S, Vukic V, Ilicic M, Popovic Lj, Kanuric K. 2014. The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage. *J Funct Foods*, 10:336-345.
4. Sfakianakis P, Tzia C. 2014. Conventional and innovative processing of milk for yogurt manufacture; development of texture and flavor: A review. *Foods*, 3: 176-193.
5. Bachrouri M, Quinto EJ, Mora MT. 2006. Kinetic parameters of *Escherichia coli* O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. *Int Dairy J*, 16 (5): 474-481.
6. Cangarella F, Nespica ML, Giontella D, Trovatelli LD. 1999. Survival of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas paucimobilis* in yoghurts manufactured from cow's milk and soy milk during storage at different temperatures. *J Microbiol Res*, 154: 15-21.
7. Massa S, Altieri C, Quranta V, De Pace R. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 °C. *Lett Appl Microbiol*, 24: 347-350.
8. Pazakova J, Turek P, Laciakova A. 1997. The survival of *Staphylococcus aureus* during the fermentation and storage of yoghurt. *J Appl Microbiol*, 82: 659-662.
9. Morgan D, Newman CP, Hutchinson DN, Walker AM, Rowe B, Majid F. 1993. Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiol Infect*, 111: 181-187.
10. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. Estimates of foodborne illness in the United States. http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated4-13.pdf (Accessed 06 March 2016).
11. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. 2011. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17 (1): 7-15.
12. Crim SM, Iwamoto M, Huang, JY, Griffin PM, Gilliss D, Cronquist AB, Cartter M, Tobin-D'Angelo M, Blythe D, Smith K, Lathrop S, Zansky S, Cieslak PR, Dunn J, Holt KG, Lance S, Tauxe R, Henao OL. 2014. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. Centers for disease control and prevention (CDC). *Morb Mortal Wkly Rep*, 63 (15): 328-332.
13. Szczawinska ME, Szczawinski J. 2011. Effect of storage temperature on survival rate of *Salmonella* Enteritidis in yoghurt. *Analele Universitatii din Craiova, seria Agricultura – Montanologie – Cadastru*, 41: 243-246.
14. FDA. 2012. Interactive food defense workshop with government & industry representatives at the 2012 food safety summit. <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodDefense/UCM303901.pdf> (Accessed 06 March 2016).
15. Bachrouri M, Quinto EJ, Mora MT. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during storage of yogurt at different temperatures. *J Food Sci*, 67 (5): 1989-1903.
16. Ogwaro BA, Gibson H, Whitehead M, Hill DJ. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *Int J Food Microbiol*, 79: 105-112.
17. Akkaya L, Telli R, Sağdıç O. 2009. Growth-death kinetics of *Listeria monocytogenes* in strained yogurt. *Int J Food Prop*, 12: 705-712.
18. Bednarko-Mlynarczyk E, Sztejn J, Bialobrzewski I, Wiszniewska-Laszczych A, Liedtke K. 2015. Modeling the kinetics of survival of *Staphylococcus aureus* in regional yogurt from goat's milk. *Pol J Vet Sci*, 18 (1): 39-45.
19. Al-Haddad KSH. 2003. Survival of *Salmonellae* in bioyoghurt. *Int J Dairy Technol*, 56: 199-202.
20. Alvarez-Ordóñez A, Valdes L, Bernardo A, Prieto M, Lopez, M. 2013. Survival of acid adapted and non-acid adapted *Salmonella* Typhimurium in pasteurized orange juice and yogurt under different storage temperatures. *Food Sci Technol Int*, 19 (5): 407-414.

21. Anonim 2005. Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Ed: A. K. Halkman. Başak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, 358 sayfa.
22. Kumbhar SB, Ghosh JS, Samudre SP. 2009. Microbiological analysis of pathogenic organisms in indigenous fermented milk products. *Adv J Food Sci Technol*, 1 (1): 35-38.
23. Cirone K, Huberman Y, Morsella C, Méndez L, Jorge M, Paolicchi F. 2013. Growth of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* Enteritidis during Preparation and Storage of Yogurt. *ISRN Microbiol*, 1-7.
24. Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Pavunc AL, Habjanic K, Matosic S. 2010. Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotech*, 48 (3): 296-307.
25. Shen HW, Yu RC, Chou CC. 2007. Acid adaptation affects the viability of *Salmonella* Typhimurium during the lactic fermentation of skim milk and product storage. *Int J Food Microbiol*, 114: 380-385.
26. Tan SM, Lee SM, Dykes GA. 2014. Buffering effect of chicken skin and meat protects *Salmonella enterica* strains against hydrochloric acid but not organic acid treatment. *Food Control*, 42: 329-334.
27. Oscar TP. 1998. Growth kinetics of *Salmonella* isolates in a laboratory medium as affected by isolate and holding temperature. *J Food Protect*, 61 (8): 964-968.

GIDA KAYNAKLI ENTEROKOKLARIN POTANSİYEL RİSK FAKTÖRLERİ

Didem Akpınar Kankaya*, Banu Özden Tuncer, Yasin Tuncer

Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş tarihi / *Received*: 25.04.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 09.06.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 10.06.2016

Özet

Enterokoklar insan ve hayvan sindirim sisteminin yanı sıra çevresel kaynaklardan da izole edilebilen laktik asit bakterileridir (LAB). Enterokoklar farklı sıcaklık ve pH derecelerine dayanıklı olmalarının yanında ekstrem tuz konsantrasyonunda da gelişebilme yeteneklerinden dolayı fermente gıdalardan yüksek sıklıkla izole edilirler. Enterokoklar sahip oldukları çeşitli teknolojik özellikleri sayesinde geleneksel fermente gıdaların tipik tat ve aromasının geliştirilmesinde uzun yıllardır yaygın olarak kullanılmakta ayrıca ürünlerin raf ömrünün uzatılmasına da katkı sağlamaktadırlar. Çeşitli yararlı özelliklere sahip olmalarına rağmen enterokoklar, artan antibiyotik direnci, çeşitli hastalıklara sebep olan virülens faktörlere sahip olmaları, biyofilm ve biyojen amin üretme özellikleri nedeniyle insan sağlığı açısından ciddi risk oluşturmaktadırlar. Bu derlemede enterokokların antibiyotik direnç mekanizmaları, çeşitli virülens faktörleri ile biyofilm ve biyojen amin üretme özellikleri irdelenmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Enterokok, antibiyotik direnci, virülens faktör, biyofilm, biyojen amin

POTENTIAL RISK FACTORS OF FOOD ORIGINATED ENTEROCOCCI

Abstract

Enterococci are lactic acid bacteria (LAB), isolated from human and animal digestive tract in addition environmental sources. Enterococci are often isolated from fermented foods because of resistant to different temperature and pH and also ability of growing at extreme salt concentration. Enterococci have been used in traditional fermented food products to improve their typical taste and aroma due to various technological properties for many years. They also contribute to increase of product's shelf life. Although enterococci have various useful properties, they pose serious risk factors for human health due to increasing antibiotic resistance, to pose virulence factors that cause various diseases, production properties of biofilm and biogenic amines. In this review mechanism of antibiotic resistance, various virulence factors, biofilm and biogenic amine production properties of enterococci were attempted to be examined.

Keywords: Enterococci, antibiotic resistance, virulence factor, biofilm, biogenic amine

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ddmakpınar@hotmail.com,

☎ (+90) 246 211 1713,

☎ (+90) 246 237 0437

GİRİŞ

Laktik asit bakterilerinin (LAB) önemli bir üyesi olan enterokoklar özellikle Akdeniz ülkelerinde üretilen geleneksel fermente ürünlerin olgunlaştırılmasında önemli rol oynamaktadırlar (1). Enterokoklar lipolitik ve esterolitik aktiviteleri ve sitrat kullanımı gibi metabolik faaliyetleri sayesinde bu gıdaların tipik tat ve aromalarının oluşumuna katkı sağladıkları gibi yakın akraba türler ve *Listeria monocytogenes* başta olmak üzere çeşitli gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı etkili bakteriyosinler (enterosin) üreterek de ürünün raf ömrünün uzamasına katkıda bulunmaktadırlar (2-4).

Enterokoklar peynir, sosis, sucuk, deniz ürünleri, kırmızı et ve kanatlı etleri gibi başta hayvansal gıdalar olmak üzere, su ve bitkilerden de yaygın olarak izole edilmektedirler (5, 6). Yapılan çalışmalar hayvansal gıdalardan sıklıkla izole edilen enterokok türlerinin *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans* olduğunu göstermiştir (4, 7-10). Hayvansal gıdalardan izole edilen enterokok türleri arasında *E. faecalis*'in görülme sıklığının diğer türlere nazaran daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4, 7). Enterokokların bazı teknolojik ve probiyotik özelliklere sahip oldukları bilinmesine rağmen, bu bakterilerin sahip oldukları virülens özellikleri ve artan antibiyotik dirençleri fırsatçı patojen olarak kabul edilmelerine neden olmuştur. Enterokoklar özellikle endokardit, bakteriyemi, idrar yolları, merkezi sinir sistemi, karın içi ve pelvik enfeksiyonlara neden olmaktadır (1). *E. faecalis* ve *E. faecium* kaynaklı enfeksiyonlar, Dünya genelinde en sık karşılaşılan klinik enfeksiyonlar arasında yer almaktadır (11). *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. raffinosus* kaynaklı enfeksiyonların ise görülme sıklığının daha düşük olduğu belirtilmektedir (12, 13). Gıda kaynaklı enterokokların tüketici sağlığı açısından bir diğer risk faktörü biyojen amin üretimidir. Yüksek miktarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi ciddi sağlık problemlerine yol açabilmektedir (14-16).

ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Antibiyotik direnci, bakterilerin antimikrobiyel bir ajanın öldürücü ya da üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneği olarak ifade edilmektedir.

Enterokoklar klinik olarak kullanılan temel grup antibiyotiklere karşı doğal veya kazanılmış direnç gösterebilirler (17). Doğal direnç bakterinin temel özelliği olup, antibiyotik kullanımı ile ilişkili değildir. Bu durum bakterinin antibiyotiğin hedefi olan yapıyı taşıması ya da bakterinin yapısal özelliklerinden dolayı antibiyotiğin hedefine ulaşmamasından kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan bakteri genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak antibiyotiklere karşı sonradan direnç kazanabilmektedir. Enterokoklar antibiyotik direnç genlerinin yayılmasını kolaylaştıran etkin genetik mekanizmalara sahiptirler (6).

Antibiyotik dirençli enterokoklar sadece klinik alanda değil aynı zamanda gıda endüstrisinde ve çiftlik hayvanlarıyla yakın temasta bulunan kişilerde de yaygın olarak karşılaşılan bir problemdir (18, 19). Antimikrobiyel ajanlar, besi hayvanlarında çeşitli hastalıkların tedavi edilmesinde, bakteriyel enfeksiyonlardan korumada ve gelişimi desteklemek amacıyla yem katkısı olarak kullanılmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ile antibiyotik direncinin artışı arasındaki ilişki yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Farklı veterinerlik uygulamaları nedeniyle dirençli bakteri oranlarında ülkelere bağlı farklılıklar gözlenmektedir. Özellikle kümes hayvanları, inekler ve domuzlardan glikopeptid dirençli *E. faecium* uzun yıllardır izole edilebilmektedir. Bazı ülkelerde makrolid dirençli enterokokların domuzlarda kümes hayvanlarından daha yüksek oranda gözlemlendiği belirtilirken, bazı ülkelerde de daha düşük direnç gözlemlendiği belirtilmektedir. Çeşitli ülkelerde ise quinupristin/dalfopristin dirençli *E. faecium* görülme sıklığının daha yüksek olduğu belirtilmektedir (17). Özellikle Avrupa ve Asya'da çiftlik hayvanlarının beslenmesinde büyüme faktörü ve koruyucu ajan olarak avoparsin katkılı yemlerin kullanımı vankomisin dirençli enterokokların (VRE'nin) görülme sıklığını arttırmıştır (20, 21). İnsan tedavisinde kullanılan antibiyotikler ile hayvanlarda gelişim artırıcı olarak kullanılan antibiyotikler arasında çapraz direnç bulunmaktadır. Çapraz direnç sonucunda hayvan gelişiminde kullanılan antimikrobiyeller, insanlarda tedavi amacıyla kullanılan ilaçlara dirence neden olmaktadır (22). Antibiyotik direnci yaygın antibiyotik kullanımının yanı sıra bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma mekanizmalarına bağlı olarak da ortaya çıkmaktadır.

Antibiyotik direncinin bakteriler arasında plazmit ve transpozon aracılığıyla aktarılabildiği, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (19, 23-26).

Enterokoklarda 8 tip (VanA, VanB, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM ve VanN) sonradan kazanılan (acquired) glikopeptid direnci rapor edilmiş olmakla birlikte VanC *E. gallinarum* ve *E. casseliflavus*'da tanımlanmış doğal tip glikopeptid direncidir. Glikopeptidler peptidoglukan biyosentezini etkileyerek bakteriyel gelişimi inhibe ederler (27, 28). Glikopeptid direnci için biyokimyasal temel, antibiyotik hedefinin modifikasyonudur. Glikopeptid direnç gen kümeleri ligaz genlerine göre D-Ala-D-Lac ligaz ve D-Ala-D-Ser ligaz olarak adlandırılırlar. Glikopeptid dirençli enterokoklar D-Ala-D-Ala yerine, D-Ala-D-Lac (*vanA*, *vanB*, *vanD* ve *vanM*) veya D-Ala-D-Ser (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* ve *vanN*) şeklinde sonlanan peptidoglukan öncülleri üreterek antibiyotiklerin bağlanma özelliğini azaltmaktadır. Enterokoklarda en sık rastlanan glikopeptid direnç fenotipi VanA tipidir ve genellikle yüksek vankomisin direnci (Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) 128 µg/mL) ile ilişkilidir. VanA tipi direnç gösteren suşların çoğu, aynı zamanda teikoplanine (MİK 8 µg/mL) karşı da dirençlidir. Bu tip direnç, glikopeptidler (vankomisin, teikoplanin, avoparsin ve ristosetin) ve basitrasin, polimiksin B veya robenidin gibi farklı antibiyotikler tarafından indüklenebilir. VanA fenotipi Tn1546 transpozonu üzerinde kodlu vankomisin direnç fenotipi oluşması için elzem olan 7 gen (*vanRSHXYZ*) içermektedir (17). VRE suşlarında vankomisin direnci iki bileşenli regülatör sistem (*vanR-vanS*) tarafından düzenlenmektedir. *vanS* geni tarafından kodlanan VanS vankomisin varlığını veya vankomisinin hücre duvarında meydana getirdiği ilk değişiklikleri tespit eden sensör olarak görev görür. VanS daha sonra yanıt regülatörü olan VanR'ye bir sinyal iletir ve VanR vankomisin direncinde görev alan diğer proteinlerin (VanH, VanA, VanX) sentezinin aktivasyonunu sağlar. VanH, pirüvatı D-Lac'a indirgeyen bir dehidrogenaz iken VanA, D-Ala ve D-Lac arasındaki ester bağlarını düzenleyen bir ligazdır. Vankomisinin D-Ala-D-Lac ucuna bağlanamaması sonucu vankomisine karşı dirençlilik gelişir. VanX, peptidoglukan bileşimini D-Ala-D-Ala'ya hidroliz eden bir dipeptidazdır ve bu olay vankomisine karşı duyarlılık gelişmesini önler. VanY, son

peptidoglukan kalıntılarının D-Ala ucunu hidroliz eden bir D, D-karboksipeptidazdır. Böylece D-Ala-D-Lac ucu, vankomisin direnci ile sonuçlanan peptidoglukan sentezinde, dipeptidin D-Ala-D-Ala ucunda yer alır. VanZ direnç mekanizmasının gelişmesinde yardımcı olup teikoplanin direncini de tetiklemektedir, ancak bu mekanizma henüz tam olarak anlaşılammıştır (28).

Enterokok cinsi üyesi bakteriler genellikle penisilin, ampisilin, piperasilin ve imipenem gibi β-laktam grubu antibiyotiklere karşı doğal olarak düşük seviyede direnç gösterirler (29). β-laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin temel mekanizması, düşük affinitede penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) sentezlenmesidir. β-laktam direnci, β-laktam halkasının parçalanması sonucu ortaya çıkar. Eğer bakteri β-laktamaz veya penisilinaz enzimlerini üretiyorsa, bu enzimler antibiyotiğin β-laktam halkasını parçalayarak antibiyotiği etkisiz hale getirirler (30). β-laktam grubu antibiyotiklere karşı bir başka direnç mekanizması *E. faecium*'da tanımlanmıştır. Bu direnç mekanizmasında penisilin duyarlı DD-transpeptidaz enziminden farklı olarak bir LD-transpeptidaz görev almaktadır. Bu LD-transpeptidaz enzimi düşük konsantrasyonlarda (% 0.7) bulunur ancak β-laktamlara karşı duyarlı değildir. Dolayısıyla mutasyonlar ağırlıklı olarak LD-transpeptidaz fenotiplerin oluşmasına yol açmakta ve bu da β-laktam dirençli suşların görülmesine olanak sağlamaktadır (17).

Aminoglikozit grubu antibiyotikler 30S ribozomal alt ünitesinde 16S rRNA'ya bağlanarak protein sentezine engel olurlar (28). Yapılan çalışmalar, enterokokların aminoglikozitlere karşı geliştirdiği 3 tip direnç mekanizması olduğunu göstermiştir (31). Tüm enterokoklar, düşük hücrel geçirgenliklerinden dolayı aminoglikozitlere karşı orta seviyede doğal direnç (MİK, 62-500 µg/mL) gösterirler. Penisilin, aminoglikozitlerin hücre içine girişini kolaylaştırdığından bu doğal aminoglikozit direnci penisilin ilavesiyle çözümlenebilmektedir. Yüksek seviyede aminoglikozit direnci 30S ribozomal alt ünitesindeki bir proteini etkileyen belirli mutasyonlar sonucunda meydana gelmektedir (17). Bir diğer aminoglikozit direnç mekanizması ise rRNA metiltransferaz (EfmM) enziminin aktivitesi sonucu 16S rRNA modifikasyonu ile meydana gelmektedir (32). Aminoglikozitlere karşı yüksek seviyelerdeki dirençlilik, antibiyotik moleküllerini inaktive edebilen enzimlerin

sentezlenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Aminoglikozitlere karşı oluşan yüksek dirençlilik genelde fosfotransferazlar (APHs), asetiltransferazlar (AACs) ve nükleotidiltransferazlar (ANTs) gibi aminoglikozit modifiye edici enzimlerin aktiviteleri sonucu gerçekleşmektedir (17). Özellikle et ürünlerinden izole edilen enterokokların streptomisin dışındaki aminoglikozitlere yüksek oranda direnç gösterdikleri belirtilmiştir (33-35).

Makrolid ve linkozamid grubu antibiyotikler ribozomun 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedirler. Bu grup antibiyotikler enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmamasına karşın penisilin alerjisi olan kişilerde penisilin yerine makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin tercih edilmesinin, enterokoklar arasında bu grup antibiyotiklere karşı direncin görülme sıklığını arttırdığı düşünülmektedir (28). Makrolid grubu antibiyotiklere karşı en yaygın gözlenen kazanılmış direnç, makrolidin ribozoma bağlanma affinitesini azaltan 23S rRNA alt ünitesinin metillenmesidir (Örneğin; *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *ermTR* genleri). Bu modifikasyon linkozamidlerin de bağlanma affinitesini azaltmaktadır (17, 28). Antibiyotik molekülünün lakton halkasının hidrolizi de diğer bir direnç mekanizmasıdır. Başka bir direnç mekanizması ise eflüks pompalarıyla antibiyotik moleküllerinin bakteri hücrelerinden uzaklaştırılmasıdır (Örneğin; *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrC* ve *mreA* genleri) (17). En sık rastlanan makrolid direnç determinantları *erm* genleridir. Bu genler bir metiltransferaz enzimi kodlamaktadır. Bu enzim 23S rRNA alt ünitesindeki adenin molekülünün N6-dimetilasyonuna neden olarak eritromisin bağlanmasını engellemektedir (36). Ribozomal hedefin modifikasyonu, makrolidler, linkozamidler ile streptogramin B arasında veya makrolidler ile linkozamidler arasında veya makrolidler, ketolidler ile streptogramin A ve B arasında çapraz dirence neden olmaktadır. Tanımlanmış *erm* genleri arasında enterokoklarda en sık rastlanana *ermB* genidir (34, 37, 38).

Tetrasiklin direnci klinik kaynaklı enterokok izolatlarında sıklıkla karşılaşılan bir antibiyotik direnci olmakla birlikte, çeşitli hayvansal gıdalarda da dirençli suşların varlığı tespit edilmiştir (4, 9). Enterokoklarda tetrasiklin direnci genellikle ribozomal koruma sağlayan *tet(M)* geni ile ilişkilidir. Ancak ribozomal korumayla ilişkili *tet(O)* ve

tet(S) gibi başka genler de tanımlanmıştır (39). Klinik izolatlarda *tet(M)* geninin genellikle Tn916 transpozonu üzerinde bulunduğu bunun yanı sıra konjugatif plazmit veya kromozom üzerinde de bulunabildiği bildirilmiştir. *tet(K)* ve *tet(L)* genleri tetrasiklinin dışarı atılmasını sağlayan pompaların kodlanmasında görevlidir (40). Diğer direnç genleri ise ribozoma bağlanarak onun yapısını modifiye eden ve tetrasiklinin ribozomlarla birleşmesini engelleyen proteinler kodlarlar (17).

Rifampisin RNA polimerazın β alt ünitesine (RpoB) bağlanıp, transkripsiyonun başlamasını engelleyerek bakteriyel gelişimi önlemektedir. Çoğu bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde kullanılan rifampisin enterokok enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmamasına rağmen enterokoklarda sıklıkla kazanılmış rifampisin direnci gözlenmektedir. Bu durumun diğer bakteriyel enfeksiyonların tedavisi sırasında kommensal enterokokların antibiyotiğe maruz kalması ile oluştuğu düşünülmektedir. Doğal rifampisin dirençli *E. faecalis* ve *E. faecium* mutantlarının *in vitro* olarak izole edildiği belirtilmiştir (41). *rpoB* mutasyonu ile meydana gelen rifampisin direnci sefalosporin direncini etkilemezken, *rpoB* H486Y mutasyonunun sefalosporin direncinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (28).

Kinolonlar enterokoklara karşı orta seviyede aktivite göstermesine karşın, klinik uygulamalarda florokinolonların kullanılması enterokokların bu antibiyotiğe direnç kazanmasına neden olmaktadır. Kinolonlar özellikle DNA süper sarmalının kontrolünde görevli tip II topoizomerazlara (DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV) bağlanıp fonksiyonlarını yerine getirmelerini engelleyerek bakteri gelişimini inhibe etmektedirler. DNA girazın GryA ve topoizomeraz IV'ün ParC alt ünitelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda antibiyotiğin enzime bağlanması engellendiğinden enterokoklarda kinolon direnci ortaya çıkmaktadır (42, 43). Kinolonlara karşı tanımlanan bir diğer direnç mekanizması ise Qnr ailesi proteinler tarafından DNA giraz ve topoizomeraz IV'ün kinolonlardan korunmasıyla sağlanmaktadır (44). Kinolonlara karşı gözlenen üçüncü direnç mekanizması ise eflüks pompaları ile antibiyotiğin hücre dışına atılmasıdır. EmeA (45) ve EfrAB (46) kinolon direnci için tanımlanan eflüks pompalarıdır.

Oksazolidinon grubu antibiyotiklerin temsilcisi olan linezolid Gram pozitif bakterilere karşı yüksek

antimikrobiyel aktivite (MİK, 4 µg/mL) gösterir (47). 23S ribozomal alt üniteye meydana gelen mutasyon bu antibiyotiğe karşı direnç (MİK, 8 µg/mL) oluşmasına neden olmaktadır. Meydana gelen direnç seviyesi mutasyona uğrayan rRNA genlerinin allellerinin sayısına bağlıdır. Linezolid dirençli suşlar aynı zamanda vankomisin, ampisilin, makrolidler, florokinolonlar, kloramfenikol, rifampin, gentamisin, nitrofurantoin ve trimetoprim/sülfametoksazol gibi diğer antibiyotiklere karşı da direnç gösterebilirler (48).

Kloramfenikol direnci çoğunlukla kloramfenikolü inaktive eden kloramfenikol asetiltransferazların varlığı ile gerçekleşmektedir. Membrana özel taşıyıcılar ile antibiyotığın dışarı atılması diğer bir direnç mekanizmasını oluşturmaktadır. Kloramfenikol asetiltransferazları ve özel taşıyıcıları kodlayan genler sıklıkla plazmitler, transpozonlar veya gen kasetleri ile ilgilidir. Kloramfenikol direnci aynı zamanda dış membran proteinlerinin ekspresyonunun azalmasına neden olan 23S rRNA'da meydana gelen mutasyonlar, kloramfenikolün 3-O-fosfotransferazlar ile inaktive edilmesi veya 23S rRNA metilaz ile hedef bölgenin modifikasyonu ile de oluşmaktadır (49).

VİRÜLENS FAKTÖRLER

Mikroorganizmaların hastalık yapıcı etkisini arttıran efektör moleküller virülens faktörler olarak isimlendirilmektedir. Enterokoklar arasında en yüksek virülense tıbbi izolatlar sahipken, bu sıralamayı gıda izolatları ile starter suşlar izlemektedir (50, 51). Enterokoklarda sitolizin/hemolizin, jelatinaz, agregasyon maddesi (Agg), adhezin kollojen (Ace, Acm), hücre dışı yüzey proteini (Esp), seks feromonları, adhezin benzeri endokarditis antijenleri (EfaA) ve hiyalüronidaz (hyl) gibi virülens faktörlerin bulunduğu belirtilmektedir (52, 53).

Agregasyon maddesi (Agg) *E. faecalis* suşlarında tanımlanan bir yüzey proteini olup, agregat oluşturarak konjugasyon süresince plazmit transferini kolaylaştırmaktadır (54, 55). Agg enterokokal hücre yüzeyinin hidrofobitesini arttırmaktadır. Bu durum kolesterol lokalizasyonuna sebep olarak kolesterolün lizozomal araçlarla birleşmesini geciktirir veya engeller (56). Agg integrinler tarafından tanınan Arg-Gly-Asp aminoasit motifini içerir. Bu sayede Agg insan makrofajları ve farklı intestinal epitelyum hücreleri gibi çeşitli hücrelere

bağlanabilirler. Hem adhezin hem de invazın olarak görev yaptığından önemli bir virülens faktör olarak değerlendirilmektedir (57, 58). *E. faecalis*'de tanımlanan diğer bir yüzey proteini adhezin kollojen (Ace)'dir. Hücre dışı matriks proteinlerine bağlanmayı sağladığından özellikle *E. faecalis* endokarditlerinde yaygın olarak Ace ile karşılaşılmaktadır (54).

Hücre dışı yüzey proteini (Esp), hücre duvarıyla ilişkili bir protein olup ilk kez *E. faecalis* MMH5594 suşunda tanımlanmıştır (59). 5622 baz çifti içeren *esp* geni tarafından kodlanan Esp, klinik izolatlarda sıklıkla görülmektedir. Esp'nin adezyon ve kolonizasyonu desteklediği, bağışıklık sistemini engellediği ve antibiyotik direnci üzerinde de rol oynadığı belirtilmektedir (1). Esp'nin aynı zamanda çevresel strese direnç sağlayan enterokokal biyofilm oluşumunda ve üriner sistem gibi ökaryotik hücrelere adezyonu sağlamada da etkili olduğu belirtilmektedir (60, 61). Yapılan çalışmalarda *esp* genindeki bozulmanın *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma yeteneğini de engellediği, *esp* *E. faecalis* suşlarına plazmit aracılığı ile *esp* geninin aktarılmasından sonra ise biyofilm üretebildikleri belirtilmiştir (62).

Enterokok türleri tarafından salgılanan virülens faktörler de patojenite üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Sitolizin/ hemolizin feromon sorumlu plazmit üzerinde yer alan genler tarafından kodlanan fakat kromozomal olarak da kodlanabilen bakteriyel bir toksindir (54). Sitolizin diğer Gram pozitif bakteriler üzerinde bakterisidal etkiye sahipken, insanlar için de β-hemolitik özellik göstermektedir. Sitolizin iki bileşenli sistemden oluşan quorum-sensing mekanizması ile kontrol edilmektedir. Sitolizinler lökositler ve makrofajlara zarar vererek immun sistem üzerinde etkili olmakta ve doku hasarına yol açmaktadırlar. Yapılan çalışmalar bu genlerin klinik izolatlarda daha yaygın gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Patojen enterokok suşlarında sitolizin üretim miktarının, patojen olmadığı düşünülen suşlardan daha fazla olduğu gösterilmiştir (63).

Hiyalüronidaz, jelatinaz ve serin proteaz gibi hidrolitik enzimlerin rolleri tam olarak bilinmese de virülens faktörler arasında yer almaktadırlar. Hiyalüronik asit üzerine etkili yıkıcı bir enzim olan hiyalüronidaz doku hasarına neden olmaktadır. Hiyalüronidaz kromozomal *hyl* geni üzerinde kodlanmıştır. Hiyalüronidaz dokulardaki

mukopolisakkaritleri parçalayarak enterokokların ve toksinlerinin konak hücrede yayılmasını kolaylaştırmaktadır (64). Jelatinaz, *E. faecalis* tarafından sentezlenen ekstraselüler çinko içeren metaloendopeptidazdır (54). Jelatinaz jelatin, kazein, hemogloblin ve diğer biyoaktif peptitlerin hidrolizine neden olarak dokularda bakteriyel yayılımı arttırmaktadır (65, 66). Jelatinaz üretiminden sorumlu *gelE* geni kromozomal DNA üzerinde kodludur ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak regüle edilmektedir (18).

Seks feromonları kromozomal DNA üzerinde kodlu, suşlar arasında plazmit DNA'nın konjugatif transferini kolaylaştıran ve 7-8 aminoasit uzunluğunda küçük, hidrofobik peptitlerdir. Enterokok suşlarında seks feromonlarının üretimi virülens determinantların ve antibiyotik dirençliliğinin feromon yanıt veren konjugatif plazmitler (pheromone-responding conjugative plasmids) aracılığı ile diğer enterokok suşlarına yayılmasını teşvik etmektedir. Bu durum patojenitenin diğer bakterilere aktarılmasını yaygınlaştırmaktadır (64, 67).

Yapılan çalışmalar özellikle klinik enterokok izolatlarında virülens faktörlerin yaygın olarak gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Elde edilen klinik izolatlarda çoğu virülens genlerin (*cylA*, *gelE*, *efaA*, *ace*, *asa*) bulunduğu ancak bazı durumlarda fenotipik olarak düşük seviyede gözlemlendiği belirtilmiştir. Diğer taraftan enterokoklarda bulunan virülens faktörlerin izolatan kaynağına göre farklılık gösterdiği ifade edilmektedir. Endodontik enterokok izolatlarında ifade edilmeyen virülens genler tespit edilirken, klinik enfeksiyonlardan izole edilen enterokok suşlarında daha fazla virülens faktör gözlemlendiği belirtilmiştir (7, 68). Valenzuela vd. (69), deniz ürünlerinden izole ettikleri *E. faecium*'larda yaygın olarak *efaA_{fm}* virülens faktörünün gözlemlendiğini, *gelE*, *esp* ve *ccf*'nin ise yalnızca bir izolatta bulunduğunu belirtmişlerdir. İnoğlu ve Tuncer (53) tulum peynirinden elde ettikleri *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının hepsinin en az bir virülens faktör taşıdıklarını, *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *ccf*, *sp_{fm}*, *esp_{fs}* ve *agg*'nin izolatlarda tespit edilen virülens faktörler olduklarını belirtmişlerdir. Farklı bir çalışmada keçi sütünden izole edilen *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. hirae* izolatlarının hepsinde *esp* ve *gelE* varlığı tespit edilmesine karşın jelatinaz üretimi fenotipik olarak sadece üç adet *E. faecalis*'de tespit edilmiştir (70). Farklı kaynaklar kullanılarak yapılan çalışmalar

bitkisel ve hayvansal kaynaklı fermente ürünlerden izole edilen enterokoklarla, probiyotik ve starter kültür olarak kullanılan enterokokların sahip oldukları virülens faktörler nedeniyle daha iyi incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (53, 71).

BIYOFİLM ÜRETİMİ

Biyofilm ekzopolimerik bileşenler, proteinler, nükleik asit ve polisakkaritlerden oluşan sulu bir matris olup, çeşitli canlı ve cansız yüzeyler üzerine tutunmuş hücre popülasyonudur (72). Biyofilm oluşumu yüzeye tutunma ve bağlanma, hücreler arası interaksiyon, bitişik bir biyofilm oluşumu ve üç boyutlu biyofilm oluşumu olmak üzere kompleks bir dizi basamaktan oluşmaktadır. Biyofilm içerisindeki bakteriler serbest hallerinden daha farklı özellik göstermektedir (73). Biyofilm içerisindeki organizmalar besin eksikliği, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı planktonik bakterilerden daha dirençlidirler. Olgun bir biyofilm tabakası, normal bir bakterinin öldürülmesi için gerekli antibiyotik konsantrasyonunun 10-1000 kat fazlasını tolere edebilmektedir. Biyofilmler birçok hastalığın kaynağı olup ortadan kaldırılması oldukça zordur. Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) hastalıkların % 60'ının biyofilm oluşturan bakterilerden kaynaklandığını belirtmektedir (74). Biyofilm içerisindeki bakteriler, kalp kapakçık iltihabı, ateşli yara enfeksiyonları, kronik orta kulak iltihabı ve kistik fibröz gibi hastalıklara sebep olmanın yanında kateterler, yapay kalp pilleri, protez kalp kapakçıkları ve ortopedik cihazlar gibi çeşitli medikal ekipmanlar üzerinde de kolonize olabilmektedir (73).

Ortamda bulunan glukoz, serum gibi besin elementleri ile demir ve karbondioksit kullanılabiliği, ozmotik basınç, pH ve sıcaklık biyofilm üretimini etkileyen faktörlerdir. Karbonhidrat metabolizması, *E. faecalis*'in de arasında bulunduğu çeşitli Gram pozitif bakterilerin biyofilm üretimini düzenlemektedir (75). *E. faecalis* tarafından biyofilm oluşumunda Esp adhezyon proteini (enterokokal yüzey proteini), *epb* lokusu tarafından kodlanan pili, lipoteikoik asit (LTA) alanin esterifikasyonu (DltA) ve hücre duvarı ile ilişkili polisakkaritin sentezi için gerekli glikotransferazın (Epa) dahil olduğu pek çok mekanizma tanımlanmıştır (73, 76-79). Ancak bu mekanizmalar içerisinde en iyi tanımlanan Esp'dir. Esp epitel

yüzeyle tutunma, biyofilm oluşturma gibi özelliklerinden sorumludur. Yapılan çoğu çalışma ile *esp*⁺ izolatların biyofilm oluşturduğu, *esp*⁻ izolatlarda ise biyofilm oluşumunun gözlenmediği tespit edilmiştir (60, 80). Diğer taraftan *esp_{fm}* geni taşıyan *E. faecalis* suşlarının bu geni taşımayan suşlara göre daha yüksek konjugasyon oranına sahip olduğu ve ampisilin, siprofloksasin ve imipenem antibiyotiklerine daha yüksek direnç gösterdiği belirtilmiştir (65). Biyofilm oluşumunda bir diğer önemli faktör polisakkarit antijenleridir. Polisakkarit antijenleri enterokokal polisakkarit antijen (*epa*) gen kümesinde de bulunan *orfde1*'den *orfde16*'ya kadar sıralanan genler tarafından kodlanmaktadır. Yapılan çalışmalar polisakkarit sentezi için *orfde4* (*epaB*) ve *orfde6* (*epaE*) genlerinin gerekli olduğunu göstermiştir (76, 77).

BIYOJEN AMİN ÜRETİMİ

Biyojen aminler aminoasitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyonu ve transaminasyonu ile oluşan, düşük molekül ağırlıklı, toksik azotlu bileşiklerdir (81-83). Aminoasitlerden karbondioksitin ayrılması olarak tanımlanan dekarboksilasyon olayı, dekarboksilaz enzimi ile gerçekleşmekte ve bu enzim bitkisel ve hayvansal dokular ile mikroorganizmalar tarafından oluşturulabilmektedir (84). Gıdalarda biyojen amin oluşumu çoğunlukla serbest aminoasitlerin mikrobiyel dekarboksilasyonu sonucu meydana gelmektedir (85). Biyojen aminler çoğunlukla balık ve balık ürünleri, fermente et ve süt ürünleri ile çeşitli fermente gıdalarda gözlenmektedir. Gıda ve içeceklerde karşılaşılan en önemli biyojen aminler sırasıyla histidin, tirozin, ornitin, lizin ve β -fenilalanin dekarboksilasyonu sonucu ortaya çıkan histamin, tiramin, putresin, kadaverin ve β -feniletilamindir (86). Biyojen aminler kimyasal yapılarına göre alifatik (putresin, kadaverin, spermin, spermidin), aromatik (tiramin, feniletilamin) ve heterosiklik (histamin, triptamin) olarak sınıflandırılabilirler gibi amin gruplarına göre monoaminler (tiramin, feniletilamin), diaminler (putresin, kadaverin) ve poliaminler (spermin, spermidin) olarak da sınıflandırılabilirler. Biyojen aminlerin oluşumu pH ve sıcaklık gibi çevresel koşulların yanı sıra, ortamda serbest aminoasitlerin ve

yüksek dekarboksilaz enzim aktivitesine sahip mikroorganizmaların varlığı ile mikroorganizmaların gelişimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (87, 88). Biyojen amin biyosentezi ökaryotik hücrelerde hormon, alkaloid, nükleik asit ve protein sentezleri için elzemdir. Bazı biyojen aminler nörotransmitter olarak görev alırken, bazıları da DNA, RNA ve protein sentezinin düzenlenmesi gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Biyojen amin üretimi bakterilerde enerji eldesi için bir yol olabileceği gibi ozmotik ve oksidatif stres yanıtları gibi diğer fizyolojik fonksiyonlara da aracılık edebilmektedir (88). Biyojen aminler çeşitli biyolojik faktörler için gerekli olsalar da gıdalarla birlikte yüksek oranda tüketilmeleri toksik etkiye sebep olmaktadır. Düşük oranlarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi durumunda biyojen aminler oksidazlar vasıtasıyla sindirim sisteminde fizyolojik olarak daha az aktif formlara dönüştürülmektedir. Ancak yüksek miktarlarda biyojen amin içeren gıdaların tüketilmesi veya çeşitli nedenlerle detoksifikasyonun engellenmesi sonucunda adrenal ve noradrenalin salınımı, mide asidi salgılanması, migren, taşikardi, kalp hastalıkları, kan şekeri ve kan basıncının yükselmesi gibi ciddi problemlere yol açmaktadır (14-16).

Biyojen amin üretimi, dekarboksilaz ve aminoasit/amin değişimi için gerekli olan en az iki genin ifade edilmesi ile gerçekleşmektedir. Bu genler daima bağlı olmakla birlikte bazı durumlarda regülasyon için üçüncü bir genle organize olabilmektedir. Biyojen amin üretimi için histidin dekarboksilaz (*hdc*), tirozin dekarboksilaz (*tdc*), lizin dekarboksilaz (*ldc*) ve ornitin dekarboksilaz (*odc*) genleri farklı bakteri suşlarında tespit edilmiştir. Biyojen amin üretimi için gerekli genler bazı durumlarda plazmit üzerinde kodlanmışken, bazı durumlarda yatay gen transferi ile de kazanılmış olabilmektedir. Biyojen amin üretimi genel olarak suşa özgü bir özellik iken tiramin biyosentezi *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. durans*'da tür düzeyinde bir özellik olarak tanımlanmaktadır (89). Çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda farklı enterokok suşlarının biyojen amin üreticisi oldukları belirtilmiştir (10, 53, 90). Dondurulmuş sardalya ve uskumrudan izole edilen *E. durans* suşlarının tiramin üreticisi olup, *tdc* genine sahip oldukları belirtilirken (84), şaraptan izole edilen *E. faecium* suşlarının hepsinde tiramin üretimi tespit edilmiş, histamin ve putresin üretimine

rastlanmadığı bildirilmiştir (91). Pişmemiş deniz ürünlerinden elde edilen *E. faecium* izolatlarında ise histamin, tiramin, putresin ve kadaverin üretimlerine rastlandığı ifade edilmiştir (69). Jiménez vd. (92) tarafından yapılan çalışmada farklı memeli sütlerinden elde edilen enterokok izolatlarının hepsinde (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*) tiramin üretimi tespit edilirken, histamin üretimi gözlenmemiştir. Diğer taraftan tüm *E. faecalis* izolatlarında ise putresin üretimi tespit edilmiştir. İnoğlu ve Tuncer (53) Tulum peynirinden izole edilen enterokok suşlarının histidin, lizin, ornitin dekarboksilasyonuna sahip olmadıklarını ancak izolatların % 92.9'unun *tdc* genine sahip olup, tiramin üreticisi olduklarını belirtmiştir. Yüceer ve Özden Tuncer (10) tarafından yapılan çalışmada sucuk örneklerinden izole edilen LAB'nin hiçbirinde histidin, lizin, ornitin dekarboksilasyonu ve dekarboksilasyon genleri (*bdc*, *ldc*, *odc*) tespit edilemezken, enterokok suşlarının % 68'inde tirozin dekarboksilaz geninin (*tdc*) tespit edildiği ve bu suşların tiramin üreticisi oldukları belirtilmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarla enterokoklarda özellikle tiramin üretiminin oldukça yaygın olduğu belirtilmiştir (8, 70, 91, 93-96).

SONUÇ

LAB'nin önemli bir üyesi olan enterokoklar farklı metabolik aktiviteleri sayesinde çeşitli geleneksel fermente gıdaların kendilerine has tat ve aromalarının oluşmasında önemli rol oynamalarının yanı sıra bazı türlerinin fırsatçı patojen oldukları bilinmektedir. Gıda kaynaklı enterokokların aktarılabildiği antibiyotik direnç genlerine sahip olmaları, plazmit ve transpozonlar aracılığı ile antibiyotik direncinin insan sindirim sisteminde diğer enterokoklara veya bakteri türlerine aktarım riskini ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle antibiyotik dirençli gıda kaynaklı enterokoklar direnç genlerinin yayılımı için rezervuar görevi görmektedir. Antibiyotik direncinin yanı sıra enterokoklar tüketici sağlığı açısından risk teşkil eden çeşitli virülens faktörlere, biyofilm ve biyojen amin üretim özelliğine sahiptirler. Bu nedenle starter kültür olarak kullanılacak enterokok suşlarının seçiminde teknolojik özelliklerinin yanı sıra antibiyotik direnci, virülens faktör içermesi ve biyojen amin üretimi gibi özelliklerinin de seçim kriteri olarak göz önüne alınması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, de Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106: 1-24.
2. Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Galvez A. 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol*, 151: 125-140.
3. Özden Tuncer B, Ay Z, Tuncer Y. 2013. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *Turk J Biol*, 37: 443-449.
4. Morandi S, Silveti T, Miranda Lopez JM, Brasca M. 2015. Antimicrobial activity, antibiotic resistance and the safety of lactic acid bacteria in raw milk Valtellina Casera Cheese. *J Food Safety*, 35: 193-205.
5. Komprda T, Sladkova P, Petirova E, Dohnal V, Burdychova R. 2010. Tyrosine and histidine-decarboxylase positive lactic acid bacteria and enterococci in dry fermented sausages. *Meat Sci*, 86: 870-877.
6. Werner G, Coque TM, Franz CMAP, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, van Schaik W, Weaver K. 2013. Antibiotic resistant enterococci-Tales of a drug resistance gene trafficker. *IJMM Int J Med Microbiol*, 303: 360-379.
7. Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Nalepa B, Laniewska-Trokenheim L. 2012. Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in ready-to-eat food of animal origin. *Afr J Microbiol Res*, 6 (39): 6773-6780.
8. Tuncer Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *Afr J Biotechnol*, 8 (24): 7008-7016.
9. Yoğurtçu NN, Tuncer Y. 2013. Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *Int J Dairy Technol*, 66 (2): 236-242.
10. Yüceer Ö, Özden Tuncer B. 2015. Determination of antibiotic resistance and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from fermented Turkish Sausage (Sucuk). *J Food Safety*, 35: 276-285.
11. ECDC. 2011. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe, Stockholm, SE.

12. Tanasupawat S, Sukontasing S, Lee JS. 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 1630-1634.
13. Dahlén G, Blomqvist S, Almståhl A, Carlén A. 2012. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol*, 4: 10855. DOI: 10.3402/jom.v4i0.10855
14. Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res Int*, 29: 675-690.
15. Ladero V, Calles Enr quez M, Fernández M, Alvarez MA, 2010. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr Nutr Food Sci*, 6: 145-156.
16. Talon R, Leroy S. 2011. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Sci*, 89: 303-309.
17. Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. 2014. Antimicrobial resistance in enterococci. *J Infect Dis Ther*, 2 (4): doi: 10.4172/2332-0877.1000150.
18. Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155 (6): 1749-1757.
19. Getachew Y, Hassan L, Zakaria Z, Zaid CZM, Yardi A, Shukor RA, Marawin LT, Embong F, Aziz SA. 2012. Characterization and risk factors of vancomycin-resistant enterococci (VRE) among animal-affiliated workers in Malaysia. *J Appl Microbiol*, 113: 1184-1195.
20. Jung WK, Lim JY, Kwon NH, Kim JM, Hong SK, Koo HC, Kim SH, Park YH. 2007. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *Int J Food Microbiol*, 113: 102-107.
21. Chan YY, Nasir MHBA, Yahaya MAB, Salleh NMAB, Dan ADBM, Musa AMB, Ravichandran M. 2008. Low prevalence of vancomycin and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. *Int J Food Microbiol*, 122: 221-226.
22. Coglian C, Goossens H, Greko C. 2011. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. Banning nonessential antibiotic uses in food animals is intended to reduce pools of resistance genes. *Microbe*, 6 (6): 274-279.
23. Marshall BM, Levy SB. 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin Microbiol Rev*, 24: 718-732.
24. Frye JG, Lindsey RL, Meinersmann RJ, Berrang ME, Jackson CR, Englen MD, Turpin JB, Fedorka-Cray JP. 2011. Related antimicrobial resistance genes detected in different bacterial species co-isolated from swine fecal samples. *Foodborne Pathog Dis*, 8: 663-679.
25. Harada T, Kawahara R, Kanki M, Taguchi M, Kumeda Y. 2012. Isolation and characterization of vanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus cecorum* from retail poultry in Japan. *Int J Food Microbiol*, 153: 372-377.
26. Glenn LM, Englen MD, Lindsey RL, Frank JF, Turpin JE, Berrang M E, Meinersmann RJ, Fedorka-Cray PJ, Frye, JG. 2012. Analysis of antimicrobial resistance genes detected in multiple-drug-resistant *Escherichia coli* isolates from broiler chicken carcasses. *Microb Drug Resist*, 18: 453-463.
27. Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*, 42 (1): 25-34.
28. Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. 2014. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N. (Ed.), Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/> (Erişim tarihi Ocak 2016).
29. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. 1998. Multiple-drug resistant enterococci: The nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis*, 4 (2): 239-249.
30. Templer SP. 2006. Antibiotic Resistant Enterococci From Food and Clinical Samples: Microbiological Characterization, Molecular Typing and Genetic Relation of Strains. Inauguraldissertation der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bern, M. Sc. Thesis, Zürich, 72 p.
31. Chow JW. 2000. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin Infect Dis*, 31: 586-589.
32. Galloway-Pe a J, Roh JH, Latorre M, Qin X, Murray BE. 2012. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS one*, 7 (1): 1-10.
33. Ribeiro T, Oliveira M, Fraqueza MJ, Laukova A, Elias M, Tenreiro R, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. 2011. Antibiotic resistance and virulence factors among enterococci isolated from chourico, a traditional Portuguese dry fermented sausage. *J Food Prot*, 74: 465-469.

34. Jamet E, Akary E, Poisson MA, Chamba JF, Bertrand X, Serror P. 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol*, 31: 191-198.
35. Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L. 2012. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol*, 156: 222-230.
36. Pechère JC. 2001. Macrolide resistance mechanisms in Gram-positive cocci. *Int J Antimicrob Agents*, 18: 25-28.
37. Martel A, Meulenaere V, Devriese LA, Decostere A, Haesebrouck F. 2003. Macrolide and lincosamide resistance in the Gram-positive nasal and tonsillar flora of pigs. *Microb Drug Resist*, 9: 293-297.
38. Jaglic Z, Vlkova H, Bardou J, Michu E, Cervinkova D, Babak V. 2012. Distribution, characterization and genetic bases of erythromycin resistance in staphylococci and enterococci originating from livestock. *Zoonoses Public Health*, 59 (3): 202-211.
39. Aarestrup FM, Agero Y, Gerner Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 37: 127-137.
40. Leclercq R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis*, 24: 80-84.
41. Kristich CJ, Little JL, Hall CL, Hoff J.S. 2011. Reciprocal regulation of cephalosporin resistance in *Enterococcus faecalis*. *mBio*, 2 (6): e 00199-11.
42. Werner G, Fleige C, Ewert B, Laverde Gomez JA, Klare I, Witte W. 2010. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int J Antimicrob Agents*, 35 (2): 119-125.
43. Palmer KL, Daniel A, Hardy C, Silverman J, Gilmore M.S. 2011. Genetic basis for daptomycin resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (7): 3345-3356.
44. Mascher T, Helmann JD, Uden G. 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70 (4): 910-938.
45. Jung YH, Shin ES, Kim O, Yoo JS, Lee KM, Yoo JI, Chung GT, Lee YS. 2010. Characterization of two newly identified genes, *vgaD* and *vatG*, conferring resistance to streptogramin A in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54 (11): 4744-4749.
46. Valenzuela, AS, Lerma, LL, Benomar N, Gálvez A, Pulido, RP, Abriouel H. 2013. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne Pathog Dis*, 10: 143-149.
47. Diekema DJ, Jones RN. 2001. Oxazolidinone antibiotics. *Lancet*, 358: 1975-1982.
48. Jones RN, Della Latta P, Lee LV, Biedenbach DJ. 2002. Linezolid-resistant *Enterococcus faecium* isolated from a patient without prior exposure to an oxazolidinone: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 42 (2): 137-139.
49. Roberts, MC, Schwarz S. 2009. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms. In: *Antimicrobial Drug Resistance*, Mayers, ML (ed.), Humana Press, pp. 183-193.
50. Busani L, Del Grosso M, Paladini C, Graziani C, Pantosti A, Biavasco F, Caprioli A. 2004. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int J Food Microbiol*, 97: 17-22.
51. Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NM, Franz CM, Holzapfel WH, Pérez-Pulido R, Martínez Canamero M, Gálvez A. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst Appl Microbiol*, 27, 118-130.
52. Willems RJ, Bonten MJ. 2007. Glycopeptide resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Dis*, 20: 384-390.
53. İnoğlu Z, Tuncer Y. 2013. Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish Tulum Cheese. *J Food Safety*, 33: 369-377.
54. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22: 822-830.

55. Hällgren A, Claesson C, Saeedi B, Monstein HJ, Hanberger H, Nilsson LE. 2008. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol*, 299 (5): 323-332
56. Eaton TJ, Gasson MJ. 2002. A variant enterococcal surface protein Espfm in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 216: 269-275.
57. Saringen S, Rozdzinski E, Muscholl Silberhorn A, Marre R. 2000. Aggregation substance increases adherence and internalization but not translocation of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. *Infect Immun*, 68 (10): 6044-6047.
58. Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, Baghdayan A, Gilmore MS, Charbonnè F, Joly B. 2002. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res Microbiol*, 15: 375-380.
59. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke M, Lindahl G, Gilmore M. 1999. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun*, 67: 193-200.
60. Toledo Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta Cuceralla, C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 67 (10): 4538-4545.
61. Borgmann S, Niklas DM, Klare I, Zabel LT, Buchenau P, Autenrieth IB, Heeg P. 2004. Two episodes of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*, 207: 386-389.
62. Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. 2006. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*, 329 (11): 849-857.
63. Fernandes SC, Dhanashree B. 2013. Drug resistance virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. *Indian J Med Res*, 137 (5): 981-985.
64. Kayaoglu G, Rstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15: 308-320.
65. Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. 2008. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*, 32 (5): 374-377.
66. Worth LJ, Slavin MA, Vankerckhoven V, Goossens H, Grabsch EA, Thursky KA. 2008. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian Patients with haematological disorders. *J Hosp Infect*, 68 (2): 137-144.
67. Devriese LA, Baele M, Butaye P. 2006. The genus *Enterococcus*: taxonomy. *Prokaryotes*, 4: 163-174.
68. Solheim M, Aakra Å, Snipen LG, Brede DA, Nes I. 2009. Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC Genomics*, 10: 194-205.
69. Valenzuela AS, Benomar N, Abriouel H, Ca amero MM, Gálvez A. 2010. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol*, 27: 955-961
70. Perin LM, Miranda RO, Todorov SD, de Melo Franco BDG, Nero LA. 2014. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int J Food Microbiol* 185: 121-126.
71. Trivedi K, Cupakova S, Karpiskova R. 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med*, 56 (7): 352-357.
72. Costerton JW. 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends Microbiol*, 9: 50-52.
73. Mohamed JA, Huang DB. 2007. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol*, 56: 1581-1588.
74. Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 999-1007.
75. Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering Jr RC, Murray BE, Inouye RT. 2004. Effects of glucose on fsr-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, 190: 967-970.
76. Xu Y, Singh KV, Qin X, Murray BE, Weinstock GM. 2000. Analysis of gene cluster of *Enterococcus faecalis* involved in polysaccharide biosynthesis. *Infect Immun*, 68 (2): 815-823.

77. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 72: 3658-3663.
78. Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J. 2006. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 74 (7): 4164-4171.
79. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, Murray BE. 2006. Endocarditis and biofilm associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Investig*, 116: 2799-2807.
80. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. 2004. Enterococcal surface protein Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 72: 6032-6039.
81. Bardócz S. 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends Food Sci Technol*, 6: 341-346.
82. Santos S, 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int J Food Microbiol*, 29: 213-231.
83. Gingerich TM, Lorca T, Flick GJ, Pierson MD, Mc Nair HM. 1999. Biogenic amine survey and organoleptic changes in fresh stored and temperature abused bluefish. *J Food Protect*, 62: 1033-1037.
84. Fadhlaoui-Zid K, Curiel JA, Landeta G, Fattouch S, Rever n I, de las Rivas B, Sadok S, Muñoz R. 2012. Biogenic amine production by bacteria isolated from ice-preserved sardine and mackerel. *Food Control*, 25: 89-95.
85. Halász A, Baráth , Simon Sarkadi L, Holzapfel W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci Technol*, 5: 42-49.
86. Alvarez MA, Moreno Arribas MV. 2014. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci Technol*, 39: 146-155.
87. Ladero V, Sánchez Llana E, Fernández M, Alvarez MA. 2011. Survival of biogenic amine-producing dairy LAB strains at pasteurisation conditions. *Int J Food Sci Technol*, 46: 516-521.
88. Linares DM, Martin C, Ladero V, Alvarez MA, Frenández M. 2011. Biogenic amines in dairy products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51: 691-703.
89. Ladero V, Fernández M, Calles Enriquez M, Sánchez Llana E, Ca edo E, Martin MC, Alvarez MA. 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol*, 30: 132-138.
90. Lorencová E, Bunková L, Matoulková D, Dráb V, Pleva P, Kubán V, Bunka F. 2012. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. *Int J Food Sci Technol*, 47: 2086-2091.
91. Capozzi V, Ladero V, Beneduce L, Fernández M, Alvarez MA, Benoit B, Laurent, B, Grieco F, Spano G. 2011. Isolation and characterization of tyramine-producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Food Microbiol*, 28: 434-439.
92. Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado Barragán A, Lopez M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Alvarez MA, Torres C, Rodríguez JM. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC Microbiol*, 13 (288):1-12.
93. Kucerová K, Svobodová H, Tuma S, Ondrácková I, Plocková M. 2009. Production of biogenic amines by enterococci. *Czech J Food Sci*, 27: 50-55.
94. Lu S, Xu X, Zhou G, Zhu Z, Meng Y, Sun Y. 2010. Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. *Food Control* 21: 444-449.
95. Muñoz Atienza E, Landeta G, de Las Rivas B, Gomez Sala B, Muñoz R, Hernández PE, Cintas LM, Herranz C. 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int J Food Microbiol*, 146: 212-216.
96. Kalhotka L, Cwiková O, Črtková Kovárová V, Matousovál Z, Prichystalová J. 2012. Changes in counts of microorganisms and biogenic amines production during the manufacture of fermented sausages Polican. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 2 (2): 667-683.

KIZILÖTESİ UYGULAMA İLE YÜZEY DEKONTAMİNASYON PROSESİ SIRASINDA YUMURTA KABUĞU YÜZEY SICAKLIĞININ KIZILÖTESİ TERMOGRAFI İLE BELİRLENMESİ

Günseli Bobuş Alkaya*¹, Ferruh Erdoğan², H. İbrahim Ekiz¹

¹Mersin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mersin

²Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 05.05.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 06.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 10.06.2016

Özet

Sağlıklı kümes hayvanlarından elde edilen yumurtaların iç kısmının mikroorganizma içermediği kabul edilirken, yumurta kabuğunun oldukça fazla mikroorganizma taşıdığı bilinmektedir. Kabuktaki mikroorganizmalar mikro çatlaklardan içeriye geçebilmekte ya da proses sırasında, yumurtaların kırılmaları sürecinde yumurta içini kontamine ederek mikrobiyel bir tehlike oluşturabilmektedirler. Patojen mikroorganizmaların da bulunabileceği yumurta kabuğu dış yüzeyinin dekontaminasyonu amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Ancak yumurta beyazının ve sarısının kalite özelliklerinin değişmemesi, özellikle ısıl yöntem kullanımını kısıtlamaktadır. Isıl dekontaminasyon uygulamaları sırasında yumurtaya belirli bir sıcaklık değerinin üstünde işlem uygulanması özellikle yumurta beyazında denatürasyona bağlı kalite değişimlerine sebep olabilmektedir. Kızılötesi uygulama, yüzey dekontaminasyonu amacıyla önerilen yöntemlerden birisi olup, uygulanan sıcaklığın belli bir değeri aşmaması için hızlı ve doğru olarak belirlenmesi gerekmektedir. Genellikle ısıl çift ile yapılan sıcaklık ölçümlerinin gıda yüzeyinde uygulanmasının zorluğu daha kullanışlı yöntemlerin araştırılmasına yol açmıştır. Yapılan bu çalışmada yumurtalara uygulanacak kızılötesi dekontaminasyon işlemi yumurta kabuğu yüzey sıcaklığında meydana gelecek değişimlerin kızılötesi kamera kullanılarak belirlenmesi için bir yöntem geliştirilmiş ve sonuçlar yumurta yüzey dekontaminasyonu kapsamında değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Yüzey sıcaklığı, infrared kamera, yumurta, ısıl çift

DETERMINATION OF SURFACE TEMPERATURE OF SHELL-EGGS BY USING INFRARED THERMOGRAPHY DURING INFRARED SURFACE DECONTAMINATION PROCESS

Abstract

The interior of the eggs obtained from healthy hens might be accepted to be free of microorganisms while the outer shell surface might include various microorganisms including pathogens. These microorganisms might pass through micro-cracks in the shell, or egg constituents might be contaminated while the shells are broken by accident or for process related purposes. These cause high microbial risk. Various surface decontamination techniques for shell eggs are applied, and thermal techniques have a certain limitation not to affect the functional properties of egg constituents especially egg white. Infrared application for surface decontamination is one suggested industrial application, and like all the other thermal methods, surface temperature of the shell should not exceed a certain value and must be determined in a quick and accurate manner. Thermocouple measurements bring certain difficulty for surface temperature determination. Hence, use of more convenient methods is required. Therefore, in this study, an infrared thermography method was improved for surface temperature measurement of the eggs undergoing an infrared surface decontamination process.

Keywords: Surface temperature, infrared camera, shell egg, thermocouple

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gbobus@mersin.edu.tr,

☎ (+90) 324 361 0001/7212

(+90) 324 361 0032

GİRİŞ

Gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmak, yeni ürün geliştirmek veya mevcut ürünün kalitesini iyileştirmek gibi amaçlarla uygulanan farklı prosesler sonucu gıda ürünlerinde farklı kalite değişiklikleri meydana gelmektedir. Kalite değişimlerine sebep olan en önemli proses parametresi sıcaklıktır. Proses sırasında ürün sıcaklığında meydana gelen değişimler genellikle ısı çiftler yardımıyla ölçülebilmekte (1) ve veri toplama sistemleri yardımıyla da değerlendirilmek üzere kaydedilmektedir. Ürün yüzey sıcaklığında meydana gelen değişimlerde ise, yüzey sıcaklığının ortam sıcaklık ve ısı transfer katsayısına bağlı değişimlere duyarlı olmasından dolayı, ısı çift kullanımı ile tam ve kesin sonuçların elde edilmesi yeterli olmayıp daha yenilikçi yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Yüzey sıcaklığının doğru belirlenmesi, ürün fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinde meydana gelebilecek değişimlerin belirlenmesi açısından da önemli bir noktadır. Nunez Vega ve ark., (2016), çalışmalarında sıcaklık değişimlerine duyarlı gıdalar için yüzey sıcaklıklarının otomatik kontrolü ile ulaşılabilir maksimum yüzey sıcaklığının önlenmesini sağlayarak gıda kalitesi anlamında en iyi kuruma sonuçlarının alınabileceğini ve bu kapsamda yüzey sıcaklığı tespitinin önemini vurgulamışlardır (2). Ürün yüzey sıcaklığının doğru tespit edilebilmesi için (ilişkilendirilmek istenen özellikle doğru ilişki kurabilmek açısından) gıda türüne göre farklı yöntemler kullanılmaktadır. Knoerzer ve ark., (2012) çalışmalarında; düşük basınç mikrodalga soğuk plazma koşulları altında yaptıkları deneylerde yüzey sıcaklığının belirlenmesinin önemini vurgularken, ısı çift, dirençli termometre, thermokron ve sıcaklık indikatörleri (sıcaklığın etkisi ile renk değiştiren şerit ve bantlar) gibi farklı ölçüm yöntemlerinin kullanılabilceğinden bahsetmişlerdir (3). Huang, (2004), kızılötesi uygulama ile hindi sosislerinin yüzey pastörizasyonu ile ilgili çalışmasında sıcaklığa bağlı olarak yüzey renk değişimini incelemiştir. Bu çalışmada yüzey pastörizasyonu sırasında, yüzeye yakın bir yere yerleştirilen ısı çiftlerle ölçülerek bulunan yüzey sıcaklıkları kullanmış; ısı çiftin direk kızılötesi enerjiye maruz kalması sonucu sıcaklık artışının doğru olarak belirlenememe ihtimalinden bahsedilmiş, ancak ısı çiftin ucunun çok küçük olmasından dolayı bu hatanın ihmal edilebileceği

konusunda bir sonuca varılmıştır (4). Yapılan diğer bir çalışmada ise çileklerin yüzey dekontaminasyonu için alternatif bir teknoloji olarak uzak kızılötesi uygulama denenmiş ve ürün kalite özellikleri açısından kritik parametre 50 °C sıcaklık olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada kızılötesi kamera kullanımı ile yüzey sıcaklık ölçümleri ve simülasyon sonucu elde edilen sıcaklıklar karşılaştırılmıştır. Kullanılan iki yöntemle elde edilen sıcaklık verileri uyumluluğundan yola çıkarak proses geliştirilmesi önerilmiştir. Yani kızılötesi kamera ile ölçülen sıcaklıklar doğru olarak kabul edilip kontrol verisi olarak kullanılmıştır (5). Erdođdu ve ark., (2011), kimyon tohumlarına uygulanan morötesi ve kızılötesi kombinasyon işlem sonunda yüzeydeki sıcaklık değişiminden dolayı olan renk değişimini ölçmüşlerdir (bu çalışmada yüzey sıcaklık değişimi ile sıcaklık değişiminden etkilenen bir kalite parametresi ilişkilendirilmiştir) (6). Sturn ve ark., (2014) elma dilimleri kurutma kinetiği üzerinde çalışırken yüzey renk değişimi ve büzüşmesini, yüzey sıcaklığı ile ilişkilendirerek prosesi kontrol etmişlerdir (7).

Çiğ olarak satışa sunulan yumurtanın sağlıklı kümes hayvanlarından elde edildiği durumda içinde mikroorganizma bulunmadığı kabul edilmektedir (8). Ancak yumurta kabuğu mikroorganizma bakımından oldukça zengin olup başta koliform grubu olmak üzere birçok patojen bakteri bulundurma ihtimali bulunmaktadır. Gıda zehirlenmelerine neden olan *Salmonella* bakterisi de yumurta ve ürünlerinde önemli bir risk oluşturmaktadır. Kabukta bulunan mikrobiyel yoğunluğu azaltabilmek amacıyla uygulanan yöntemler ısı ve ısı olmayan işlemler olarak sınıflandırılabilir. Bu uygulamalar sırasında en önemli kriter yumurta içinin uygulanacak işlemde etkilenmemesi ya da minimal düzeyde etkilenmesidir (8, 9). Yumurta yüzey dekontaminasyonu amacıyla geniş uygulama alanı olan ısı işlemlerde, yüzey sıcaklığının belirlenmesi ile yumurta iç kalitesi ile ilgili yorum yapılabilmektedir. Dış yüzey sıcaklığının bilinmesi farklı matematiksel modelleme tekniklerinin kullanımı ile yumurta içi sıcaklığının belirlenmesini sağlamak ve sıcaklık değişiminden kalite parametreleri hesaplanabilmektedir. James ve ark., (2002), çalışmalarında kabuklu yumurtanın yüzey pastörizasyonunun gerekliliğinden bahsetmişlerdir. Aynı çalışmada yumurta içeriğine zarar vermeden elde edilebilir en yüksek yüzey

sıcaklığını belirlemek için kabuğun dış - iç sıcaklıklarını değerlendirmişler ve proses parametrelerini de bu sıcaklık değişimine göre belirlemişlerdir (10). Bu konuda yapılan farklı çalışmalar incelendiğinde genellikle belirli sayıda ısı çift yüzeye en yakın yere (kabuğun hemen altı) yerleştirilip ölçüm yapıldığı ve belirli sayıdaki sıcaklık ortalamalarının, yüzey sıcaklığı olarak kabul edildiği gözlenmiştir (4, 5, 11-13).

Bu çalışmada, yumurtalara uygulanacak kızılötesi ısı işlem dekontaminasyon prosesi sırasında kızılötesi kamera görüntüsü verilerinin, ürün yüzey sıcaklığının belirlenmesinde kullanımının açıklanması amaçlanmaktadır. Bu kapsamda kızılötesi kamera ile elde edilen yumurta yüzey sıcaklık verileri kullanımı ile yumurta yüzey sıcaklığının belirlenmesi konusunda bir çalışma yapılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Deneylerde kullanılacak orta boy yumurtalar Çukurova Bölgesi'ndeki yerel bir tavuk firmasından aynı kümeden olacak şekilde seçilmiştir. Isıl çift olarak yalıtılmış T tipi (30 gauge) ısı çiftler kullanılmış, ısı işlem uygulamasında kullanılan kızılötesi tünel Mersin Üniversitesi Gıda Mühendisliği'nde Dr. Ferruh Erdoğan tarafından "MÜH. F. GM (FE)2006-1" başlıklı proje kapsamında tasarlanmış (Şekil 1) ve Necat Makine A.Ş.'ye (İstanbul) yaptırılmıştır. Veri kaydedici olarak Keithley, Model 2700 DMM (USA), kızılötesi kamera olarak da FLIR- I50 sistemi (FLIR System AB, Sweden) kullanılmıştır. Isıl çiftlerin yumurta kabuğu iç yüzeyine yerleştirilmesi amacıyla kullanılan reçine yerel marketten alınmış; yumurta içinin doldurulmasında (bu kapsamda kızılötesi ısı işlem prosesinin gerçeğe uygun olarak gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır) agar (Merck - 1.01614) ve model yumurta olarak ısıl iletkenlik katsayısı yüksek malzemeden (bakırdan) yapılmış siyah boyalı yumurta şeklinde bir cisim ($k=401\text{W/mK}$, yüzey alanı= 7901mm^2) kullanılmıştır.

Yöntem

Sistem parametrelerinin belirlenmesi

Öncelikle ısıl özellikleri bilinen, ısıya dayanıklı ve emissivite değeri yüksek olan siyah boya ile boyanmış, yumurta şeklinde tamamı bakır malzemeden yapılmış cismin içerisine T tipi (30 gauge) ısı çift yerleştirilmiştir. Yüksek ısıl iletim

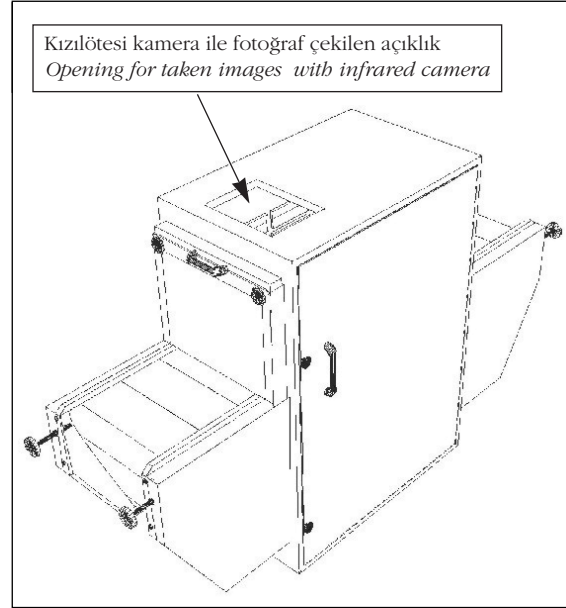
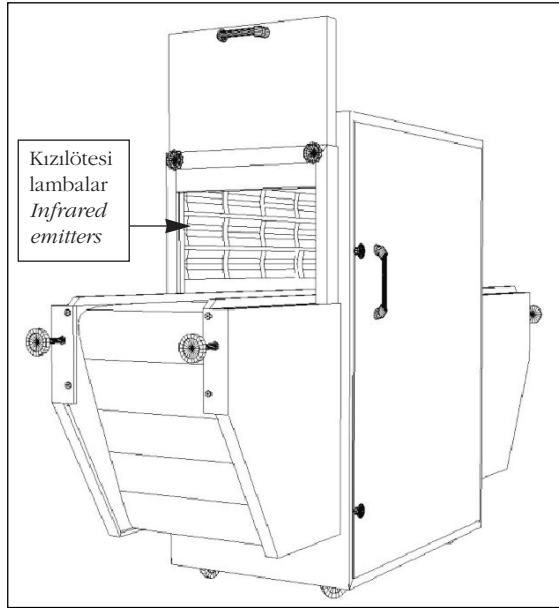
katsayısı ve kızılötesi işlem sistemlerinde oluşacak düşük ısı transfer katsayısına bağlı olarak bir lumped sistem elde edilebilir. Isıl işlem sırasında da bakır yumurtanın içerisinde, homojen bir sıcaklık dağılımı meydana gelmesi ve yumurta iç sıcaklığının yumurta yüzey sıcaklığına eşit olması doğru bir yaklaşım olarak kabul edilmiştir. Bakır yumurta emissivite değeri yüksek ($\epsilon \approx 0.95$) (14) ısıya dayanıklı bir siyah boya ile boyanmış olduğundan, radyasyonla ısı transferi kapsamında üzerine gelen bütün enerjiyi emecek bir siyah cisim olarak davranmış olacaktır.

Yüzey sıcaklık değişimlerinin belirlenmesi için kullanılan FLIR I50 kameradan elde edilen kızılötesi görüntülerin işlenmesi gerektiğinden, bu temelde öncelikle sistem içi yansımaların bir fonksiyonu olarak ortaya çıkan yansıtılan görünür sıcaklık (reflected apparent temperature - RAT) değerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla kızılötesi işlemde kullanılacak olan sistem istenilen proses sıcaklığına ulaştıktan sonra bakır yumurta, sistem içerisine yerleştirilmiş ve sıcaklık değişimi kaydedilirken, Şekil 1'de gösterildiği gibi sistemin üst tarafında bulunan açıklıktan, zamana bağlı olarak, bakır cismin yüzey sıcaklık değişimleri belirlenmiştir. Bu kapsamda herhangi bir proses zamanında ürün iç sıcaklığı ile dış yüzey sıcaklık değişiminin eşit olması gerekliliğine bağlı olarak yumurta yüzey sıcaklıklarının belirlenmesi için gerekli parametreler RAT parametresi belirlenmiş olacaktır.

Kızılötesi sistemle bu kapsamda 4 farklı proses sıcaklığında (180, 250, 300 ve 350 °C) deneyler gerçekleştirilmiş ve yumurta yüzey sıcaklığının gerçek değerine yakın olması için yumurta yüzey alanını temsil edecek bir yüzey alanı görüntüsünün elde edilmesine çalışılmıştır. Sistem tasarımında, Şekil 1'de de gösterildiği gibi, sistem yan duvarlarına yerleştirilmiş olan kızılötesi seramik ısı kaynaklarına eşit sayıda simetrik pozisyonda bulduklarından yumurta alt ve üst yüzey bölgelerinin sıcaklık değişimleri de simetrik olarak kabul edilmiştir. Bütün deneyler farklı yumurtalarda üç paralelli ve farklı zamanlarda iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

Yumurta yüzey sıcaklıklarının belirlenmesi

Ön denemelerde farklı kızılötesi proses uygulama sıcaklıklarında, farklı sürelerde proses edilen yumurtalarda proses süreleri 180 °C'de 30 – 900 s, 250 °C'de 30 – 900s , 300 °C'de 30 – 510 s ve 350 °C'de 15 – 210 s olarak uygulanmış ve sistem



Şekil 1: Kızılötesi sistemin şematik gösterimi.
Figure 1: Schematic representation of Infrared heating system.

içerisine yerleştirilmiş yumurta kızılötesi termogramları, taşıyıcı banttın 50 cm yukarıdan kızılötesi kamera kullanılarak alınmıştır. Belirlenen RAT değerleri kullanılarak yumurta yüzey sıcaklıkları hesaplanmıştır. Bir sonraki aşamada ise bu sıcaklık değişimleri yumurta kabuğu altına reçine ile iliştilen ısı çiftten elde edilen sıcaklık değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Yumurta kabuk iç yüzey sıcaklığının belirlenmesi Orta büyüklükteki yumurtanın uç kısmına iğne yardımıyla küçük bir delik açıldıktan sonra yumurta içi boşaltılıp temizlenmiş ve etüvde kurutulduktan sonra ısı çift kabuğun iç yüzeyine eritilmiş reçine yardımıyla iliştilmiştir. Daha sonra yumurta içerisi %3'lük ≈60 ml agar ile doldurulmuş (10) ve hazırlanan sistem 250 °C' ye ayarlanan sistemde proses edilirken sıcaklık değişimi belirlenmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

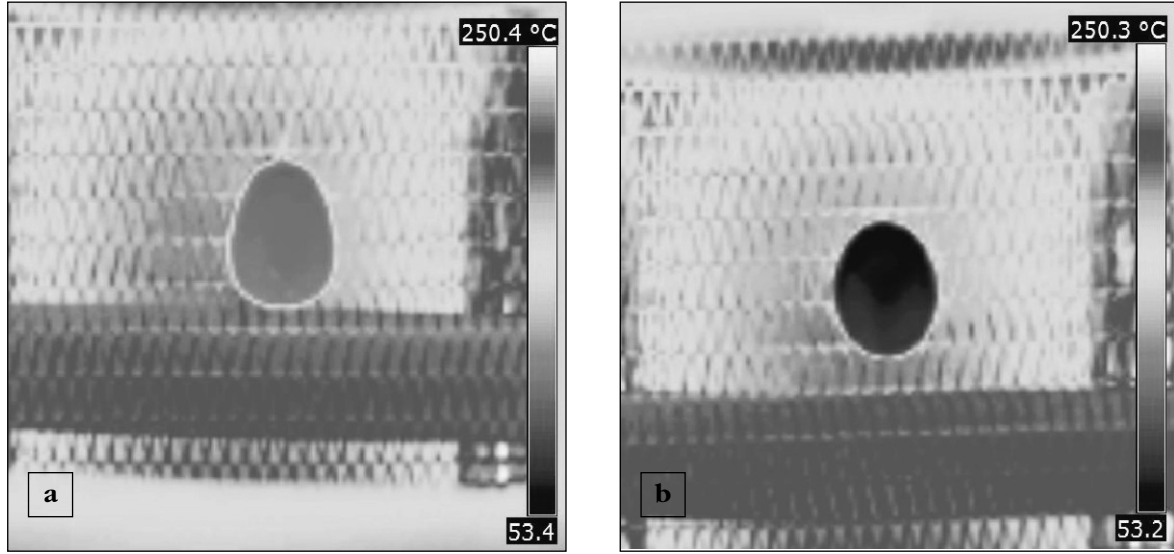
Radyasyonla ısı transferi kapsamında üzerine düşün enerjinin tamamını soğuran ideal cisimler siyah cisim olarak adlandırılmakta olup bu tanım cisimlerin yayınladıkları ve soğurdukları ısı enerjisi göreceli olarak ölçmek için geliştirilen bir kavramdır (15). Yumurta şeklindeki bakır cismin dış yüzeyi gelen ışının tamamını soğurması için (siyah cisim gibi) siyaha boyanmıştır. Işığın tamamını soğuran siyah boya için emissivite

değeri 0.95 olarak kullanılmıştır. Deneyler sırasında yüksek sıcaklıklar da kullanılacağı için yüksek sıcaklığa dayanıklı boya tercih edilmiştir. Cisim, her tarafından aynı ısı gelecek şekilde ısıtılmakta olduğundan, yüzey sıcaklığının (yumurta dış yüzeyinde de) homojene yakın olacağı varsayımı yapılmıştır (Şekil 2a). Yukarıda da açıklanan lumped sistemi yaklaşımı kapsamında ısı çift ile ölçülen ürün iç sıcaklık değeri ile dış yüzey sıcaklığının aynı olacağı yaklaşımından yola çıkarak, bakır cismin yüzeyinin kızılötesi görüntüleri alınmış ve iç sıcaklık ile dış yüzey sıcaklığının eşit olmasını sağlayan RAT parametresi hesaplanmıştır (Çizelge 1). Şekil 2 a 'da 250 °C kızılötesi işleme 330 s maruz kalmış bakır cismin yüzey kızılötesi görüntüsü gösterilmektedir. Şekil 2-b'de verilen ise 250 °C kızılötesi işleme 120 s maruz kalmış yumurta yüzeyi kızılötesi kamera görüntüsüne aittir. Bu kapsamda yapılan hesaplamalar kısaca aşağıdaki örnekle açıklanmıştır:

Kızılötesi seramik kaynak sıcaklıkları 250 °C ayarlanmış kızılötesi sistem içine yerleştirilen bakır cismin 180 s sonra sıcaklığı 55.5 °C olarak kaydedilmiştir (lumped sistem yaklaşımı ile ısıçiftle elde edilen sıcaklık ile yüzey sıcaklığı eşdeğer olacaktır). Aynı anda kızılötesi kamera ile elde edilen görüntü bu yaklaşımla işlenmiş ve gerekli parametreler, kızılötesi görüntüsünden elde edilen değer ile ısıçiftten elde edilen değerlerin eşit olması temelinde belirlenmiştir.

Çizelge 1: Kızılötesi tünel ayarlanan sıcaklıklar için FLIR sistemde kullanılan RAT değerleri
Table 1: RAT values for FLIR system at different Infrared temperature

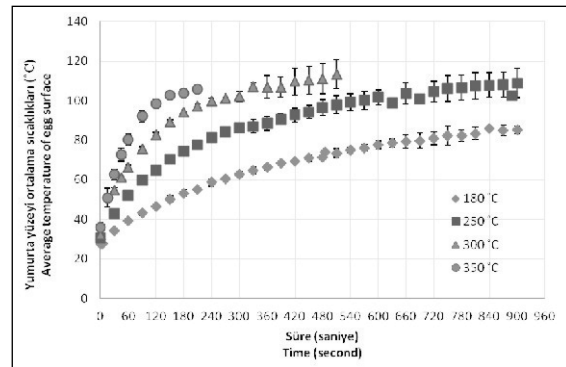
Ayarlanan Kızılötesi tünel sıcaklığı (°C) Temperature of Infrared Cabin	RAT değeri (°C) RAT value
180	188
250	276
300	316
350	380



Şekil 2: Kızılötesi kamera görüntüleri: a) 250 °C kızılötesi sistemde 330 s ısıtma işlemi uygulanmış dışı siyah boyalı bakır cismin görüntüsü (107 °C); b) 250 °C kızılötesi tünelde 120 s ısıtma işlemi görmüş yumurtanın görüntüsü (66 °C).
Figure 2: Infrared camera images of a) egg shaped - black painted - copper object Infrared heated at 250 °C for 330s (107 °C); b) whole shell egg Infrared heated at 250 °C for 120s (66 °C).

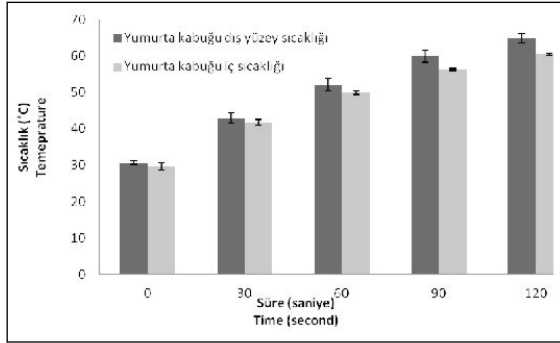
Günlük tüketimde kullanılan yumurtalar için yapılan deneylerde ise FLIR 150 sisteminde kullanılmak üzere yumurta kabuğu için emissivite değeri yine 0.95 (16, 17) olarak kabul edilmiştir. RAT değerleri olarak da Çizelge 1'deki veriler kullanılarak yumurtaların kızılötesi uygulama sırasındaki ortalama yüzey sıcaklıkları hesaplanmıştır. Farklı sıcaklıklarda işlem uygulanmış yumurtaların ortalama yüzey sıcaklıkları Şekil 3'de verilmiştir. Şekil 3 incelendiğinde kızılötesi işlem uygulanan bütün sıcaklıklarda yumurtaların başlangıç ortalama yüzey sıcaklıkları 27-36 °C arasında değişirken, sıcaklığın proses başlangıcında hızlı bir şekilde arttığı, belli bir süre sonra yavaşladığı ve sonra ise sabitlendiği gözlenmektedir. Farklı sıcaklıklarda kızılötesi işlem görmüş yumurtaların, kabuk sıcaklıkları sabitlendiğinde (kabuk deforme olmadan) kızılötesi işlemi sonlandırılmıştır. Uygulanan kızılötesi işlem ile 180 °C için 900 saniye sonra, yumurta ortalama yüzey sıcaklığı en fazla 85 °C olarak ölçülmüştür. Bu sıcaklıklar 250 - 300 ve

350 °C için, 900 - 510 ve 210 saniye sonra sırasıyla 109 - 113 - 106 °C olarak hesaplanmıştır. Deneyler sırasında 300 ve 350 °C kızılötesi işlem uygulanan yumurtaların resimleri ise belli süreler sonunda (210 ve 510 saniye) yumurta kabuğu bütünlüğünü koruyamadığı için elde edilememiştir.



Şekil 3: Farklı sıcaklıklarda kızılötesi işlem uygulanmış yumurtaların ortalama yüzey sıcaklık değişimleri.
Figure 3: Average temperature of shell egg surface processed by Infrared at different time - temperature.

Çalışmanın son aşamasında, kızılötesi kamera ile elde edilen sıcaklık verilerini doğrulamak amacıyla, yukarıda da açıklandığı şekilde bir model sistem hazırlanmış ve yumurta kabuğunun hemen altından ısı çiftle sıcaklık ölçümü alınmıştır. Elde edilen sıcaklıklar, kızılötesi kamera görüntülerinden elde edilen kabuk yüzey sıcaklıkları ile birlikte Şekil 4'de gösterilmektedir. Aynı koşullarda işlem görmüş yumurtaların, farklı iki yöntemle bulunan sıcaklık sonuçlarının birbirlerine oldukça yakın olduğu belirlenirken; aynı sıcaklıkta ve aynı sürede işlem görmüş yumurtalar için kabuk içi sıcaklığının beklendiği gibi (yumurta kabuğunun ısı transferine karşı oluşturduğu iletim direncinden dolayı) daha düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4: Kızılötesi tünelde 250 °C'de işlem görmüş yumurta kabuğu dış ve iç yüzey sıcaklıklarının karşılaştırılması.
Figure 4: Outer and inner surface average temperature of shell egg processed by Infrared heater at 250 °C.

Yumurtalarda uygulanması gerekli yüzey dekontaminasyon işlemlerinde sıcaklık önemli bir parametredir. Yumurta dış yüzey sıcaklığı artarken, yumurta iç sıcaklığının 55-60 °C'yi geçmesi, yumurta beyazında denatürasyona neden olacağı için uygulanacak proseslerin belirtilen sıcaklığı geçmemesi gerekmektedir (10, 18). Bobuş Alkaya ve ark., (2016) yaptıkları çalışmada kızılötesi kamera ile yumurta yüzey sıcaklık değişimlerini belirlemişler ve yumurta beyazında olacak denatürasyon başlangıcı ve ilerlemesini de kontrol ederek yüzey dekontaminasyonu için farklı kızılötesi proses koşullarında gerekli süreleri, *E. coli* ATCC 25922 (*Salmonella* Enteritidis yerine) hedefleyerek belirlemişlerdir. Sonuç olarak yumurta beyazında denatürasyonun başlama süresini, kızılötesi kamera ile elde edilen yüzey sıcaklık değişimleri ile tespit edebilmişlerdir (8). Benzer sonuçları; Tanaka ve ark., (2007), kızılötesi

kamera ile çekilen çilek resimlerinden buldukları ve simülasyondan elde ettikleri yüzey sıcaklıklarının uyumlu olmasından yola çıkarak, proses parametrelerini belirledikleri çalışmada elde etmişlerdir (5). Eser ve Ekiz, (2016) uzak kızılötesi koşullarda proses ettikleri fıstıklarda kalite kontrol için yüzey sıcaklığını kritik parametre olarak kullanmışlar ve yüzey sıcaklık değişimlerini de yine kızılötesi kamera kullanımı ile belirlemişlerdir (19). Eliasson ve ark., (2015), toz kırmızı biber ile yaptıkları çalışmada kızılötesi kamera görüntülerini kullanmışlar ve yüzey sıcaklıklarını belirlemişlerdir (20). Foster ve ark., (2006)'nın çalışmaları ise gıda yüzeyini kısa zamanda ısıtmak ve soğutmak için tasarlanan bir sistemde yüzey sıcaklığını anlık belirlemek ve kontrol etmek için kızılötesi kamera kullanılan başka bir çalışmadadır (21).

Kızılötesi kamera ile belirlenen yüzey sıcaklıklarının, çiğ et ve et ürünlerinin, taze meyve ve sebzelerin, kabuklu yumurtanın ve bunlara benzer sıcaklığın kritik nokta olduğu gıdaların yüzey pastörizasyonu/sterilizasyonu veya dekontaminasyonu çalışmalarında önemli bir belirteç olarak kullanılması önerilebilir. Ayrıca ısı işlem uygulanan sürekli proseslerde, kızılötesi kamera ile kritik sıcaklığı geçen ürün belirlenebilir, sonra otomatik olarak o ürünün sistemden uzaklaştırılması sağlanabilir ve böylece son ürün kalite kontrolünün de artması sağlanabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada katkısından dolayı Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonuna (BAP-2015-TP3-1164) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Roeser WmF, Mueller EF. 1930. Measurement of surface temperatures. *RP231 Bureau of Standards J Res*, 5 (4): 793-802.
2. Nunez Vega AM, Sturn B, Hofacker W. 2016. Simulation of convective drying process with automatic control of surface temperature. *J Food Eng*, 170, 16-23.
3. Knoerzer K, Murphy AB, Fresewinkel M, Sanguansri P, Coventry J. 2012. Evaluation of methods for determining food surface temperature in the presence of low-pressure cool plasma. *Innovative Food Sci Eng Technol*, 15, 23-30.

4. Huang L. 2004. Infrared surface pasteurization of Turkey frankfurters. *Innovative Food Sci Emerging Technol*, 5, 345–351.
5. Tanaka F, Verboven P, Scheerlinck N, Morita K, Iwasaki K, Nicolai B. 2007. Investigation of far infrared radiation heating as an alternative technique for surface decontamination of strawberry. *J Food Eng*, 79, 445-452.
6. Erdoğan SB, Ekiz Hİ. 2011. Effect of ultraviolet and far infrared radiation on microbial decontamination and quality of cumin seeds. *J Food Sci* 76 (5): 284-292.
7. Sturn B, Nunez Vega AM, Hofacker WC. 2014. Influence of process control strategies on drying kinetics, colour and shrinkage of air dried apples. *Applied Thermal Engineering*, 62, 455-460
8. Bobuş Alkaya G, Erdoğan F, Halkman AK, Ekiz Hİ. 2016. Surface decontamination of whole-shell eggs using far-infrared radiation. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 275-282.
9. Sarıbay MU, Köseoğlu T. 2012. Işınlanmış yumurta ve yumurta ürünlerinde kalite değişimleri. *Gıda ve Yem Bilimi – Teknoloji Dergisi*, 12, 41-48.
10. James C, Lechevalier V, Ketteringham L. 2002. Surface pasteurization of shell eggs. *J Food Eng*, 53, 193-197.
11. Ha J-W, Kang D-H. 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 annuum* L.). *Appl Environ Microbiol*, 79 (21): 6568-6575.
12. Palazoğlu TK, Coşkun Y, Tuta S, Mogol BA, Gökmen V. 2015. Effect of vacuum-combined baking of cookies on acrylamide content, texture and color. *Eur Food Res Technol*. 240, 243–249
13. Sanguinetti AM, Secchi N, Del Caro A, Fadda C, Fenu PAM, Catzeddu P, Piga A. 2015. Gluten-free fresh filled pasta: The effect of xanthan and guar gum on changes in quality parameters after pasteurization and during storage. *LWT- Food science and Technology*, 64, 678-684.
14. Çengel YA. 2003. *Heat transfer: a practical approach*, 2nd Edition, McGraw-Hill Companies.
15. Yüncü H, Kakaç S. 1999. *Temel Isı Transferi*, Bilim kitapevi.
16. Turner JS. 1985. Cooling rate and size of birds' eggs – A natural isomorphic body. *J. Therm. Biol*, 10;2, 101-104.
17. Jimenez-Munoz JC, Sobrino JA. 2012. Comment on "Ecological importance of the thermal emissivity of avian eggshells". *Journal of Theoretical Biology*, Letter to Editor, 304; 304-307.
18. Pasquali F, Fabbri A, Cevoli C, Manfreda G, Franchini A. 2010. Hot air treatment for surface decontamination of table eggs. *Food Control*, 21, 431-435.
19. Eser E, Ekiz Hİ. 2016. Surface temperature a critical parameter to control peanut quality during far infrared pretreatment process. *Int Food Res J*, (Baskıda).
20. Eliasson L, Isaksson S, Lövenklev M, Ahrne L. 2015. A comparative study of infrared and microwave heating for microbial decontamination of paprika powder. *Front Microbiol*. 6, 1-8.
21. Foster AM, Ketteringham LP, Purnell GL, Kondjoyan A, Havet M, vans J A. 2006. New apparatus to provide repeatable surface temperature-time treatments on inoculated food samples. *J Food Eng*, 76, 19-26.

BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN DONDURULARAK DEPOLANAN USKUMRU (*SCOMBER SCOMBRUS*) KIYMASINDAKİ KALİTE DEĞİŞİMLERİNE ETKİSİ

Berna Özalp Özen^{1*}, Ayla Soyer²

¹Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Atatürk Orman Çiftliği Müdürlüğü, Ankara

²Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 27.02.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 05.05.2016

Kabul tarihi / Accepted: 05.06.2016

Özet

Bu çalışmada, dondurularak depolanan uskumru kıymasının bazı kalite özelliklerine yeşil çay (YÇE), üzüm çekirdeği (ÜÇE) ve nar kabuğu (NKE) ekstraktlarının etkisi incelenmiştir. Bitkisel ekstraktların fenolik madde miktarları dikkate alınarak, son üründe toplam fenolik madde miktarı 100 mg/kg olacak şekilde örnekler hazırlanmıştır. Donmuş depolama sırasında bitkisel ekstraktların etkinliği, sentetik antioksidan (BHT) içeren ve hiçbir katkı içermeyen kontrol (K) örnekler ile karşılaştırılmıştır. Bitkisel ekstrakt ilavesi ve dondurma işlemi birlikte toplam aerob psikrofil bakteri (TAPB) sayısını azaltmıştır ($P<0.01$). Depolama sonunda TAPB sayısı en düşük NKE ilaveli örneklerde ($3.23 \log \text{KOB/g}$) belirlenmiştir ($P<0.01$). Ekstrakt ilavesi, toplam uçucu bazik nitrojen (TVB-N) ve trimetilamin nitrojeni (TMA-N) oluşumunu sınırladığıdır ($P<0.01$). TAPB sayısı, TMA-N ve TVB-N miktarları dikkate alındığında nar kabuğu ekstraktı ilavesi dondurularak depolanan kıyma uskumruların kalitesini korumada altı ay süreyle etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlar, NKE ve ÜÇE'nin dondurularak depolanan uskumru kıymasının kalitesinin daha uzun süre korunması açısından uygun doğal antimikrobiyel katkıları olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Yeşil çay ekstraktı, nar kabuğu ekstraktı, üzüm çekirdeği ekstraktı, uskumru, kalite, donmuş depolama.

EFFECTS OF PLANT EXTRACTS ON QUALITY ALTERATION IN MACKEREL (*SCOMBER SCOMBRUS*) MINCE DURING FROZEN STORAGE

Abstract

The effect of green tea (GTE), grape seed (GSE) and pomegranate rind (PRE) extract addition on quality of mackerel mince during frozen storage were investigated. Considering the quantity of plant materials phenolic content, total phenolic content of the final product was adjusted to 100 mg/kg for mince samples. Effect of plant extracts was compared with a synthetic antioxidant (BHT) and control (without any antioxidant) mince samples. Freezing process and extract treatment slowed down microbial growth ($P<0.01$). At the end of frozen storage, PRE samples significantly lowered ($3.23 \log \text{CFU/g}$) total viable count than other samples ($P<0.01$). The increase in total volatile basic nitrogen (TVB-N) and trimethylamine nitrogen (TMA-N) contents was limited by extract addition during frozen storage ($P<0.01$). According to microbial growth, and TMA-N and TVB-N contents, pomegranate rind extract retained their good quality characteristics of mackerel mince during six months of frozen storage. Among the plant extract sources used in the study, GSE and PRE had better results than GTE for prolonged protection of the quality during storage.

Keywords: Green tea extract, pomegranate rind extract, grape seed extract, mackerel, quality, frozen storage.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ bozalpozen@hotmail.com,

☎ (+90) 312 211 0262,

☎ (+90) 312 211 0262

GİRİŞ

Gıdaların düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmeleri, bir taraftan mikroorganizmaların çoğalmalarını ve faaliyetini yavaşlatırken diğer taraftan kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların hızını sınırlayarak gıdaların bozulmalarını geciktiren bir uygulamadır. Düşük sıcaklıklarda muhafaza, üründe istenmeyen mikrobiyolojik değişimleri sınırlamakta ve biyokimyasal reaksiyonları geciktirmektedir. Bununla birlikte uzun depolama sürelerinde, ürünün niteliğine bağlı olarak bazı kalite kayıpları meydana gelmektedir. Düşük sıcaklıklarda muhafaza edilen balıklarda kalite kaybına neden olan en önemli faktörler mikrobiyolojik faaliyet, lipid oksidasyonu, protein oksidasyonu ve protein denatürasyonudur. Avlandıktan sonra su ürünlerinde kalite, otolitik faaliyetlerle, sonradan kontamine olan mikroorganizmaların çoğalması ve proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin kaybolması nedenleriyle hızla azalmaktadır (1, 2). Balıkta meydana gelen otoliz, peptidlerin ve serbest aminoasitlerin oluşmasına neden olmaktadır. Meydana gelen bu bileşikler mikrobiyel çoğalma için uygun besin ortamını oluşturarak üründe kalite kayıplarına neden olmaktadır. Balık etinde meydana gelen bakteriyel bozulma et renginin de değişmesine yol açarak duysal kalitenin azalmasında etkilidir (3). Balık etinde depolama ömrünü uzatmak amacıyla sentetik katkı maddelerinin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır (4-6). Sentetik katkı maddelerinin [Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), tersiyer bütill hidroksi kinon (TBHQ)] karsinojenik etkilerinin ortaya konulması (7, 8), doğal kaynakların kullanımını gündeme getirmiştir. Bu amaçla yüksek oranda antimikrobiyel ve antioksidan özellik gösteren bitkisel ekstraktların kullanılmasına yönelik çalışmalar artmıştır (9-16). Balıkların taze olarak raf ömürleri genel olarak balığın başlangıç mikroorganizma sayısına ve depolama koşullarına bağlı olmakla birlikte oldukça sınırlıdır. Balık etlerinin de diğer gıdalar gibi, tüketime hazır gıda haline getirilmesi için depolama sırasında yaşanan problemlerin ve ekonomik kayıpların azaltılmasına yönelik araştırmalar önemlidir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda geliştirilecek yeni ürünlerin uzun raf ömrüne sahip olmaları, balık etininin her yerde ve her mevsim tüketilmesine imkan sağlayacaktır. Bu açıdan dondurularak depolanan yağlı balıklarda

antioksidan ve antimikrobiyel etkiye sahip doğal kaynakların et kalitesi üzerine etkilerinin belirleneceği araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, şarap üretiminde yan ürün olarak ortaya çıkan üzüm çekirdeği, nar suyu üretiminde yan ürün olarak ortaya çıkan nar kabuğu ve yeşil çay kullanılarak hazırlanan ekstraktların kıyma uskumruya ilave edilmesi ve donmuş depolama süresince bu ekstraktların mikrobiyel yüke, TVB-N, TMA-N oluşumuna, renk ve duysal özelliklere etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Et materyali

Araştırmada, İğne Ada (Kırklareli) bölgesinde avlanan uskumru (*Scomber scombrus*) materyal olarak kullanılmıştır. İstanbul Büyükşehir Belediyesi Toptancı Hali'ne getirilen balıklar anlaşmalı balıkçılardan satın alınmış ve buzdolana depolanarak en kısa sürede (5-6 saat) denemenin kurulacağı Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne getirilmiştir.

Bitkisel ekstraktlar

Araştırmada doğal ekstrakt kaynağı olarak laboratuvarında hazırlanan yeşil çay, nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktları kullanılmıştır. Yeni hasat edilmiş yeşil çay (*Camellia sinensis*) yaprakları, vakum ambalaj içerisinde Rize'den getirilmiştir. Üzüm çekirdekleri Kavaklıdere Şarap A.Ş.'den (Ankara) temin edilmiştir. Bu amaçla, Kalecik Karası (*Vitis vinifera*) üzümlerin şaraba işlenmesinden sonra geride kalan atığın kurutulması ile elde edilen çekirdekler kullanılmıştır. Nar kabuğu ekstraktı, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Meyve Suyu Pilot İşletmesi'nde nar meyvelerinin (*Punica granatum*) nar suyuna işlenmesinden sonra geride kalan kabuklar kullanılarak hazırlanmıştır. Araştırmada sentetik antioksidan kaynağı olarak ise bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

Bitkisel ekstraktlarının hazırlanışı

Bitkisel ekstraktların elde edilmesinde Naveena vd. (17) tarafından önerilen ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Taze olarak elde edilen yeşil çay yaprakları ve nar kabukları yaklaşık 1 cm² boyutlarındaki parçalara ayırdıktan sonra, üzüm

çekirdekleri ise elde edildiği şekli ile 60°C'deki etüvde kurutulmuştur. Kurutma işlemi yeşil çay yaprakları için 3 saat, üzüm çekirdekleri için 12 saat ve nar kabukları için ise 48 saat sürmüştür. Kurutma süresinin belirlenmesinde kurutulmuş materyalin kolaylıkla öğütülebileceği nem düzeyine kadar kurutulması esas alınmıştır. Kurutulmuş materyal, yüksek yoğunluklu polietilen ambalaj materyali ile ambalajlandıktan sonra ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilene kadar -40°C'deki derin dondurucuda (MDF-U5411 Model, Sanyo, Kore) depolanmıştır. Ekstraksiyon işleminden önce, kurutulmuş materyal laboratuvar tipi değirmende öğütülmüştür. Ekstraksiyon çözeltisi olarak destile su kullanılmıştır. 20 g kurutulmuş ve öğütülmüş nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ile 40 g yeşil çay, 500 mL kaynamış haldeki destile su ile çalkalanmalı su banyosunda 5 dakika süre ile çalkalanmıştır. Elde edilen ekstraktlar kaba filtre kağıdından filtre edildikten sonra hızla soğutulmuş denemede kullanılmıştır. Hazırlanan ekstraktların toplam fenolik madde miktarları Singleton ve Rossi (18) tarafından geliştirilen Folin-Ciocalteu yöntemiyle karakterize edilmiştir. Denemede kullanılan YÇE'nin 22.08 g gallik asit eşdeğeri/kg, NKE'nin 114.27 g gallik asit eşdeğeri/kg, ÜÇE'nin ise 33.75 g gallik asit eşdeğeri/kg düzeyinde fenolik madde içerdiği belirlenmiştir. Denemenin kurulması sırasında ürüne ilave edilecek bitkisel ekstraktların miktarları, son üründe toplam fenolik madde miktarı 100 mg/kg olacak şekilde ayarlanmıştır.

Balık kıymalarının hazırlanışı

Solungaç, sindirim içeriği, kılçık vs.den arındırılıp soğuk su ile yıkanan balıklardan derili filetolar yapılmıştır. Elde edilen filetolar 4 mm çaplı kıyma makinesi (Moulinex, Fransa) aynasından geçirilerek kıyma haline getirilmiş ve 5 gruba ayrılmıştır. Üç gruba daha önceden belirlenen düzeylerde yeşil çay (YÇE), nar kabuğu (NKE) ve üzüm çekirdeği (ÜÇE) ekstraktları, dördüncü gruba sentetik antioksidan olarak BHT ilave edilmiştir. BHT'nin su ile karışabilen çözeltisini hazırlamak amacıyla etil alkol (%96, Merck, Almanya) kullanılmıştır. Beşinci gruba ise antioksidan kaynağı ilavesiz kontrol grubu (K) oluşturmuştur. Oluşturulan tüm gruplar beş dakika elle yoğrulmuş ve 9 cm çap ve 1.5 cm kalınlıkta

(yaklaşık 90 g ağırlık) şekillendirilmiştir. Paslanmaz çelik, delikli tepsilere dizilen örnekler, -18°C sıcaklığa dondurulmuştur. Dondurma işlemi, hava akımlı dondurucuda (FRIGOSCANDIA LABoFREEZE, İsveç) sabit hava hızında (2.5 m/s) gerçekleştirilmiştir. Dondurma işlemi için dondurucu kabin iç sıcaklığı -35°C'ye ayarlanmıştır. Tepsidaki örneklerden ortadaki birinin merkezine, üst ve alt yüzeylerine 3 adet thermo-couple yerleştirilerek sıcaklık düşüşü dijital göstergeli kaydedici ile takip edilmiştir. Ulaşılmak istenen son sıcaklık (-18°C) için dengeleme, strafor termos kaplarda yapılmıştır. Örnekler yüksek yoğunluklu polietilen torbalara yerleştirilerek -18°C'de 6 ay depolanmıştır.

Kıyma örneklerde yapılan analizler

Toplam aerob psikrofil bakteri (TAPB) sayısı

Hazırlanan örneklerden aseptik koşullarda 10 g alınıp, steril Stomacher poşetlere konulmuş ve üzerine 90 mL steril peptonlu fizyolojik tuzlu su (% 1 pepton, % 0.5 NaCl) ilave edilerek, stomacherde (Seward 400 Londra, İngiltere) 230 rpm'de 2.5 dakika homojenize edilmiştir. Hazırlanan homojenattan steril peptonlu fizyolojik su ile ardışık dilüsyonlar hazırlanarak, steril petri kutularına dökme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Besiyeri olarak Plate Count Agar (Merck) kullanılmış, petriler 4°C'de 10 gün süreyle inkübe edilmiştir. Sonuçlar log KOB/g et olarak verilmiştir (19).

Toplam uçucu bazik nitrojen (TVB-N) miktarı

Toplam uçucu bazik nitrojen (TVB-N) miktarı, Goulas ve Kontominas (20) tarafından önerilen yöntemle göre belirlenmiştir. Homojen hale getirilen balık etinden 10 g tartılmış ve 50 mL destile su ile homojenize edilmiştir. Karışım 200 mL destile su kullanılarak kjeldahl balonuna aktarıldıktan sonra 2 g MgO ilave edilmiş ve köpürmeyi önlemek amacıyla 1-2 damla silikon yağı damlatılmıştır. Destilasyon ünitesinin çıkış borusuna, içerisinde 25 mL %3'lük borik asit ve 0.04 mL metil kırmızısı/metilen mavisi indikatörü ilave edilmiş erlenmayer yerleştirilerek destilasyon başlatılmıştır. Destilasyon işlemine erlenmayerde 125 mL destilat toplanıncaya kadar devam edilmiş, elde edilen destilat, 0.1 N HCl çözeltisi ile titre edilmiştir. Örnekteki TVB-N miktarı "mg/100g et" olarak hesaplanmıştır.

Trimetilamin nitrojeni (TMA-N) miktarı

Trimetilamin nitrojeni miktarı, Boland ve Paige (21)'in önerdiği yönteme göre belirlenmiştir. Homojen hale getirilen 10 g örnek, 90 mL % 7.5'lik triklorasetik asit ile karıştırılmış, 4 mL homojenat bir test tüp içerisine aktarılmıştır. Üzerine 1 mL formaldehit, 10 mL susuz toluen ve 3 mL potasyum karbonat çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Tüp içerisinden 5 mL toluen fazı alınarak bir başka test tüpüne aktarılmış, üzerine 5 mL pikrik asit çalışma çözeltisi (%0.02'lik) ilave edilmiştir. İçerik vorteks yardımıyla karıştırıldıktan sonra 410 nm'ye ayarlı spektrofotometrede (Labomed UVD-3200, CA, ABD) şahite karşı okunmuştur. TMA-N miktarı, trimetilamonyum hidroklorür (Merck, Almanya) kullanılarak hazırlanan standart eğri yardımıyla "mg/100g et" olarak hesaplanmıştır.

Renk ölçümü

Örneklerin yüzey renkleri, Minolta renk ölçüm cihazı (Minolta CR-400, Osaka, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Renk ölçümünde kullanılacak dondurulmuş örnekler buzdolabında bir süre bekletilerek buz tabakası tamamen çözündürüldükten sonra yüzeyden üç farklı noktada renk ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonucunda CIE L^* (parlaklık), a^* (kırmızılık), b^* (sarılık) değerleri belirlenmiştir.

Duyusal değerlendirme

Hazırlanan örnekler donmuş depolama süresinin başında ve sonunda çiğ olarak duyu analize tabi tutulmuştur. Örnekler koku özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Duyusal değerlendirme için kapaklı plastik kaplar kullanılmıştır. Örnekler iyice havalandırılmış duyu analiz laboratuvarında, sarı ışık altında taze balık, ransit, yağsı, boya ve kimyasal/bitkisel ekstrakt kokuları yönlerinden değerlendirilmiştir. Değerlendirmede 10 puanlı hedonik ölçek kullanılmıştır. Taze balık kokusu özelliği değerlendirilirken, 10 puan özelliğin yoğun olarak algılandığı, 0 puan ise özelliğin hiç algılanmadığı kabul edilmiş; ransit, yağsı, boya ve kimyasal/bitkisel ekstrakt kokusu özellikleri değerlendirilirken ise, 10 puan özelliğin hiç algılanmadığı, 0 puan ise yoğun olarak algılandığı kabul edilerek değerlendirme yapılmıştır (22).

İstatistik analiz

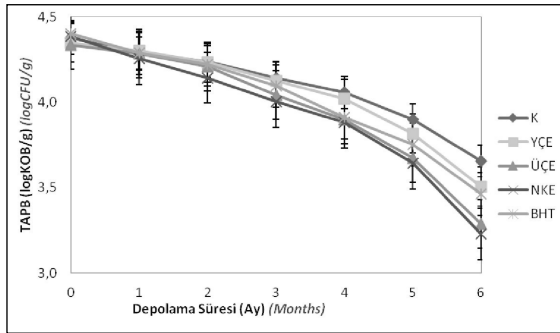
Depolama süresince uskumru kıymasına ilave edilen bitkisel ekstraktların seçilen kalite özelliklerine etkileri tesadüf parselleri deneme tertibinde faktöriyel düzende varyans analizi tekniği uygulanarak değerlendirilmiştir. Araştırma sırasında elde edilen veriler, deneme desenine uygun olarak hazırlanan tablolar halinde Minitab paket programında varyans analizine tabi tutulmuştur. Varyans analizi sonucuna göre gruplar arası farklılıklar önemli bulunduğu, Duncan çoklu karşılaştırma testi (MSTAT) kullanılarak farklılıklar gösterilmiştir (%1 veya %5) (23). İstatistik değerlendirme, her bir tekrürde aynı analiz için belirlenen 2 paralelin ortalaması üzerinden ve 2 tekrür ortalaması dikkate alınarak yapılmıştır. Renk tayininde her bir tekrürde 3 farklı noktada okuma yapılmış ve 2 tekrür ortalaması alınarak istatistik değerlendirmede kullanılmıştır. Deneme kapsamında çalışılan parametreler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon katsayısı (R) analizi ile MINITAB (Windows Release 13 MINITAB, 2000) programı kullanılarak belirlenmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Toplam aerob psikrofil bakteri sayısı

Farklı bitkisel ekstraktlar ilave edilen uskumru kıymasında donmuş depolama süresince belirlenen TAPB sayısı (logKOB/g et) şekil 1'de görülmektedir. TAPB sonuçları incelendiğinde, tüm örneklerde uzayan depolama süresine bağlı olarak azalma olduğu görülmektedir. Depolama süresinin başlangıcında 4.37 logKOB/g et olan TAPB sayısı, 6 ay sonunda 3.43 logKOB/g et bulunmuştur. TAPB sayısında meydana gelen bu azalmanın, dondurma işleminin mikroorganizmalar üzerine olan tahrip edici etkisinden ve uygulanan antioksidan kaynaklarının antibakteriyel aktivitelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Depolama süresinin başında gruplar arasında psikrofil mikroorganizma yükü açısından farklılık olmadığı ($P>0.01$), 6 aylık depolama süresi sonunda ise K grubu örneklerin en yüksek TAPB sayısına sahip olduğu (3.66 logKOB/g et), bunu sırasıyla YÇE (3.51 logKOB/g et), BHT (3.46 logKOB/g et), ÜÇE (3.29 logKOB/g et) ve NKE (3.23 logKOB/g et) içeren grupların izlediği belirlenmiştir ($P<0.01$).

Balıkta gıda güvenliği açısından izin verilen mikrobiyel yük 6.0 logKOB/g et'dir (24). Elde edilen sonuçlar ÜÇE ve NKE ilavesinin depolamanın 3. ayından itibaren etkili olduğunu ve diğer gruplara kıyasla ÜÇE VE NKE uygulanan balıkların daha düşük mikrobiyel yüke sahip oldukları belirlenmiştir. Bu durumun ÜÇE ve NKE'nın yüksek antimikrobiyel aktivitesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. ÜÇE ve NKE'nın antimikrobiyel etkisi soğukta depolanan birçok et ve et ürünüde ortaya konmuştur (25, 26, 27). Özoğul ve Uçar (28) -18°C'de dondurularak depolanan kolyoz burgerlerinin kalitesine doğal ekstraktların (kekik, yeşil çay, adaçayı ve defne ekstraktı) etkisini araştırdıkları çalışmada, toplam psikrofil sayısının uzayan depolama süresine bağlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, %0.6 düzeyinde uygulanan kekik ve yeşil çay ekstraktının toplam psikrofil sayısını azaltmada diğer uygulamalardan daha etkili olduğu da gösterilmiştir (28). Uljas ve Ingham (29), dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristallerinin bakterilerin hücre zarlarına zarar vermesine bağlı olarak depolama sırasında psikrofilik bakteri sayısının azaldığını belirlemişlerdir. Doğal ekstraktların antimikrobiyel etkilerinin gıda uygulamalarında azaldığı, düşük pH değerine sahip gıdalarda söz konusu etkinin daha yüksek olduğu ve ekstraktın gıda içerisindeki çözünürlüğü veya dokuya penetrasyonunun antimikrobiyel aktiviteyi önemli düzeyde etkilediği bilinmektedir (30, 31).



Şekil 1. Bitkisel ekstrakt ilavesinin ve dondurularak depolama süresinin uskumru kıymasının toplam aerob psikrofil bakteri (TAPB) sayısına etkisi

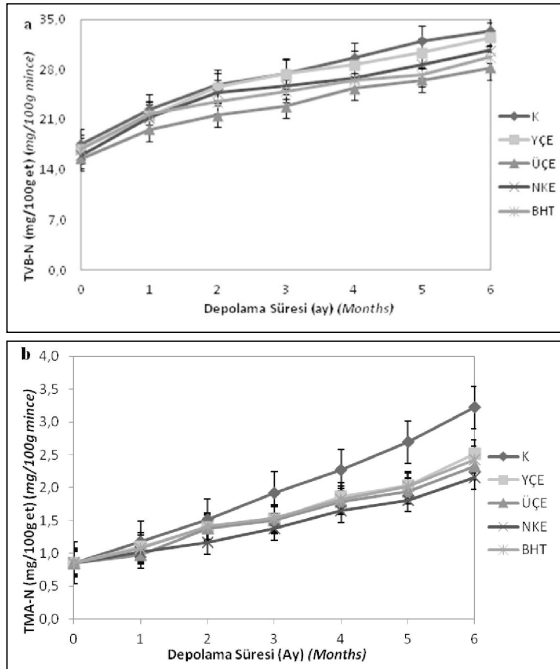
Figure 1. Effects of natural extracts and frozen storage on total aerobic psychrotrophic bacteria (TAPB) counts in minced mackerel.

Toplam uçucu bazik nitrojen ve trimetilamin nitrojeni miktarı

Farklı bitkisel ekstraktlar ilave edilen uskumru kıymasında donmuş depolama süresince belirlenen

TVB-N ve TMA-N miktarları şekil 2'de verilmiştir. Depolama süresi uzadıkça örneklerin TVB-N ve TMA-N miktarlarının arttığı belirlenmiştir. TVB-N oluşumuna ÜÇE ve NKE ilavesinin etkisi depolama başlangıcında görülmüş ve bu örneklerin TVB-N içerikleri diğer örneklerden önemli düzeyde düşük bulunmuştur ($P<0.01$). Donmuş depolama sonunda ise K (33.43 mg/100 g et) örneklerin en yüksek TVB-N miktarına sahip olduğu, bunu sırasıyla YÇE (32.44 mg/100 g et), NKE (30.68 mg/100g et), BHT (29.70 mg/100 g et) ve ÜÇE (28.22 mg/100 g et) içeren grupların izlediği tespit edilmiştir ($P<0.01$). Genellikle TVB-N miktarı 100 g ette 35-40 mg düzeylerine ulaştığında balık bozulmuş olarak nitelendirilmektedir (32). Özoğul vd. (33) morina türü balıklar için TVB-N limit değerinin 30 mg/100 g et olduğunu, 6 ay süre ile depolanan sardalya filetolarında bu sınır değerini aşılmadığını, TVB-N değeri açısından 2 dakika süre ile uygulanan %2 biberiye ekstraktının diğer uygulamalara kıyasla daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapmış olduğumuz çalışmada, kritik limit 35 mg TVB-N/100 g balık olarak kabul edilirse, donmuş depolama esnasında bu sınırın aşılmadığı, altı aylık depolama sonrasında tüm örneklerin TVB-N miktarı açısından tüketime uygun oldukları belirlenmiştir. Depolama süresince K örneklerin TMA-N miktarlarının diğer örneklerden yüksek, NKE uygulanan örneklerin ise düşük olduğu şekil 2b'de görülmektedir. Depolama süresinin başında örnekler arasında farklılık olmadığı ($P>0.01$), uzayan depolama süresince antioksidanların etkinliklerini göstererek TMA-N oluşumunu sınırlandırdıkları tespit edilmiştir ($P<0.01$). Depolama sonunda K grubuna ait balıkların (3.22 mg/100 g et) en yüksek TMA-N miktarına sahip olduğu, bu grubu sırasıyla YÇE (2.51 mg/100 g et), BHT (2.44 mg/100 g et), ÜÇE (2.33 mg/100 g et) ve NKE (2.15 mg/100 g et) içeren örneklerin izlediği belirlenmiştir ($P<0.01$). Uzayan depolama süresi ile artan TMA-N miktarının NKE ilavesi ile sınırlandırılabilceği belirlenmiştir. Balık türü, avlanma mevsimi ve depolama koşulları TMA-N miktarını etkilenmektedir (34). TMA-N düzeyine göre kalite sınıflandırılması; "4 mg/100g TMA-N'a kadar iyi, 10mg/100g TMA-N'a kadar pazarlanabilir, 12 mg/100g TMA-N bozulmuş" olarak gösterilmektedir (35, 36). Bu kalite sınıflandırılması dikkate alındığında, tüm uygulamalarda depolama süresince TMA-N değerinin 4 mg/100g TMA-N'dan düşük olduğu,

söz konusu balıkların TMA-N açısından "güvenilir" oldukları belirlenmiştir. Benzer şekilde, dondurularak depolanan balık burgerlerde kontrol grubu dışındaki diğer uygulamalarda TVB-N miktarının 9 aylık depolama süresi sonunda sınır değerlerin altında olduğu, antioksidan ekstrakt uygulamasının TVB-N oluşumunu sınırladığı gösterilmiştir (28).



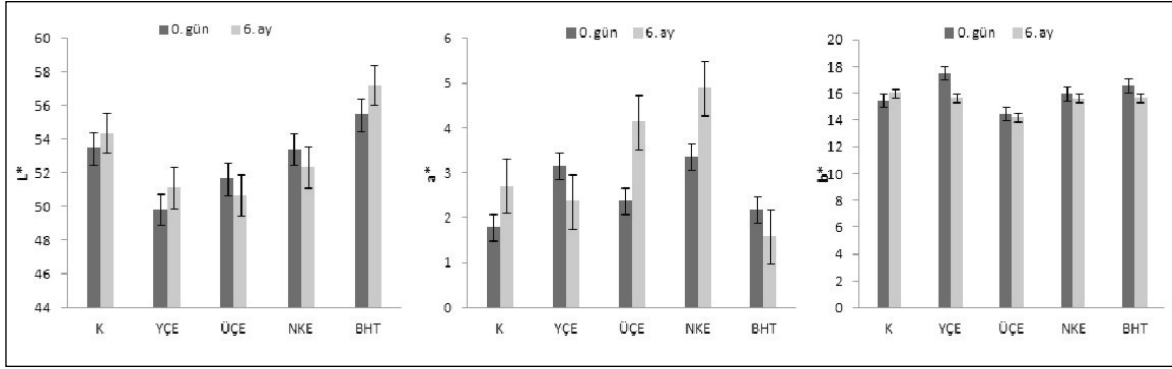
Şekil 2. Bitkisel ekstrakt ilavesinin ve dondurularak depolama süresinin uskumru kıymasının toplam uçucu bazik nitrojen (TVB-N) (a) ve trimetilamin nitrojeni (TMA-N) (b) miktarına etkisi

Figure 2. Effects of natural extracts and frozen storage on total volatile basic nitrogen (TVB-N) (a) and trimethylamin nitrogen (TMA-N) (b) in minced mackerel.

Enstrümental renk

Farklı bitkisel ekstrakt ilave edilen uskumru kıymasında donmuş depolama başlangıcında ve sonunda belirlenen L^* , a^* ve b^* değerleri şekil 3'te verilmiştir. Depolama başlangıcında en yüksek L^* değerleri BHT'li (55.46) ve K (53.45) örneklerde, en düşük ise YÇE'li (49.84) ve ÜÇE'li (51.67) örneklerde belirlenmiştir. Depolama başlangıcında L^* değeri arasındaki bu farkın kullanılan ekstraktın renginden kaynaklandığı düşünülmektedir. İlerleyen depolama süresine bağlı olarak L^* değerinin NKE'li ve ÜÇE'li örneklerde azaldığı, K, YÇE ve BHT ilave edilen

örneklerde arttığı belirlenmiştir. NKE ve ÜÇE'nin yüksek antioksidan etkisinin, L^* değerindeki azalmada etkili olduğu düşünülmektedir. Örneklerin b^* değerleri ise depolama başında 14.48 ile 17.52 arasında değişirken, depolama sonunda K örneklerde artış (16.04), antioksidan kaynağı ilave edilen örneklerde ise azalış gözlenmiştir. Bitkisel antioksidan kaynağı ilavesi, uskumru kıymaların dondurularak depolanması sırasında renk değerlerini etkilemiştir. Bunlar içerisinde NKE ve ÜÇE, depolama sonunda L^* ve b^* değerlerinde azalmaya ve a^* değerlerinde artışa neden olarak kıyma etteki pigment formlarını korumada etkili olmuşlardır. Nitekim, Lee vd. (37), antioksidanların metmyoglobin oluşumunu engelleyerek et ürünlerinde meydana gelen renk değişimini sınırladığını göstermişlerdir. Sanchez-Alonso vd. (38), farklı konsantrasyonlarda beyaz üzüm lifi içeren çiğ örneklerin a^* değerinde donmuş depolama süresince değişim olmadığını ($P>0.01$), ancak ekstrakt içermeyen kontrol örneklerinin a^* değerlerinin önemli düzeyde azaldığını tespit etmişlerdir ($P<0.01$). b^* değeri ise lif içeren örneklerde değişmemiş, ancak K örneklerinde depolama süresince artış göstermiştir. Bu durum kırmızılık değerinin azalması ve oksijene olan heme proteinlerin okside olan pigmentlerden (met-heme proteinler-kahverengi) farklı olarak parlak renk vermesiyle açıklanmıştır (38). Sanchez-Alonso ve Borderias (39) tarafından yapılan başka bir çalışmada, kıyma istavrit örneklerine ilave edilen üzüm lifinin çiğ örneklerle arasında önemli bir farklılığa neden olmadığı ($P>0.01$) ve söz konusu örneklerin 6.40-7.10 arasında değişen a^* değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Brannan (40) tarafından yapılan çalışmada ise, tavuk but etlerine %0.1 düzeyinde üzüm çekirdeği ekstraktı ilavesinin hazırlanan köftelerin renklerinin daha koyu (L^*), daha kırmızı (a^*) ve daha az sarı (b^*) olmalarına neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler bir kısım literatür bilgisi ile benzerlik gösterdiği gibi, bazı verilerden de farklılık göstermektedir. Bu durumun ilave edilen ekstraktın elde edilme yönteminden, uygulanan ekstrakt konsantrasyonundan, ekstraktların kendi renklerinden ve farklı düzeydeki antioksidan ve antimikrobiyel etkinliklerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 3. Bitkisel ekstrekt ilavesinin ve dondurularak depolama süresinin uskumru kıymasının renk değerlerine (L^* , a^* , b^*) etkisi
Figure 3. Effects of natural extracts and frozen storage on color parameters (L^* , a^* , b^*) in minced mackerel

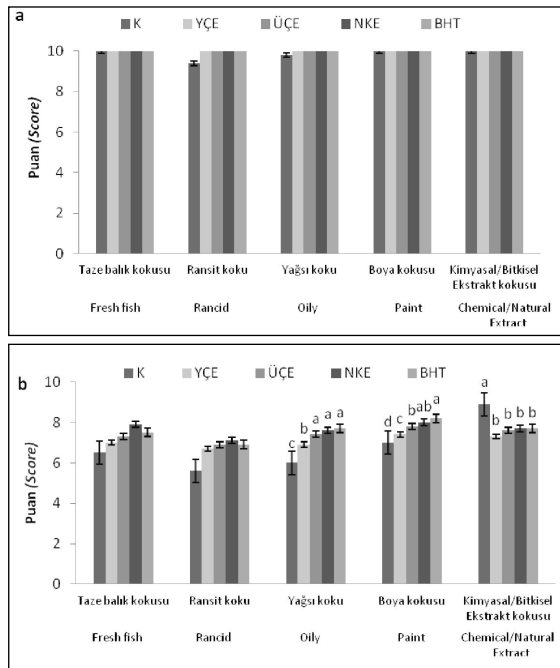
Duyusal değerlendirme

Hazırlanan kıyma uskumrular donmuş depolama süresince çığ olarak duysal analize tabi tutulmuş ve örnekler koku özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Dondurularak depolanan uskumru kıymalarında depolama süresinin başında ve sonunda panelistler tarafından verilen puanların ortalamaları şekil 4'te görülmektedir. Depolamanın başında gruplar arasında önemli farklılıklar bulunmadığı ($P>0.01$), duysal analizde incelenen özellikler açısından tüm grupların panelistler tarafından beğenildiği şekil 4a'da görülmektedir. Depolama süresi sonunda ise K grubuna ait balıkların taze balık, ransit, yağsı ve boya kokusu özellikleri açısından diğer gruplara kıyasla daha az beğenildiği; kimyasal/bitkisel ekstrakt kokusu yönünden ise daha yüksek puan aldığı görülmektedir. Bu durumun, ilave edilen ekstraktların ve BHT'nin balık dokusuna penetrasyonu ve buradaki oksidatif değişimler üzerine etkileri ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Bitkisel ekstrakt ve BHT ilave edilmeyen uskumrulara kimyasal/bitkisel ekstrakt kokusu algılanmamıştır. Kontrol örneklerde ransit koku yoğun bir şekilde hissedilirken (5.60), NKE uygulamasının ransit kokunun algılanmasını engellediği (7.10) belirlenmiştir. Oksidatif reaksiyonlar sonucu artan yağsı koku kontrol örneklerde daha fazla hissedilmiştir. Yağsı koku özelliği açısından ÜÇE, NKE ve BHT uygulamaları arasında farklılık olmadığı da ($P>0.01$) belirlenmiştir. Boya kokusu kontrol örneklerde verilen düşük puanlarla daha fazla hissedilmiştir ($P<0.01$). Panelistler taze balık, ransit, yağsı ve boya kokusu özelliklerini değerlendirdiklerinde, K grubu balıklara daha

düşük puanlar vermişlerdir. Bu durum bitkisel ekstrakt ilavesinin kıyma örneklerde istenmeyen kokunun oluşumunu engellemesi ile açıklanabilir. Ayrıca elde edilen veriler, donmuş depolanan kıyma örneklerin depolama süresi sonunda koku özellikleri açısından tüketime uygun olduğunu da göstermektedir. Duyusal değerlendirmeler sonucunda belirlenen taze balık kokusu özelliği ile TAPB sayısı ve TMA-N miktarı arasında ($r=-0.896$, $P<0.05$; $r=-0.919$, $P<0.05$), ransit koku özelliği ile TMA-N miktarı arasında ($r=-0.984$, $P<0.01$) ve yağsı koku özelliği ile TMA-N miktarı arasında ($r=-0.913$, $P<0.05$) önemli korelasyonlar olduğu da belirlenmiştir.

Donmuş depolama süresince uskumru kıymalarında oksidasyon, mikrobiyel faaliyet ve pigment denatürasyonuna bağlı olarak kalite kayıpları meydana gelmektedir. Yapılan bu çalışmada, depolama süresince uskumru kıymalarının iyi hijyenik özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir. TPAB sayısını azaltmada en etkili kaynağın NKE olduğu tespit edilmiş; bu durum, NKE'nin yüksek antimikrobiyel aktivitesiyle açıklanmıştır. Bitkisel ekstrakt ilavesi, ilave edilen bitkisel materyalin antimikrobiyel aktivitesine bağlı olarak donmuş depolama ile artan TVB-N, TMA-N miktarlarını baskılamıştır. 6 aylık donmuş depolama sonrasında balıklar, TVB-N miktarı açısından "tüketime uygun", TMA-N miktarı açısından ise "iyi" niteliktedir. Dondurularak depolanan kıyma örneklerde TMA-N miktarı ile TAPB sayısı arasında önemli düzeyde korelasyon ($r=0.892$; $P<0.05$) olduğu da belirlenmiştir. Duyusal analiz sonuçları değerlendirildiğinde, NKE'nin panelistler tarafından daha fazla beğenildiği de tespit edilmiştir. Sonuç

olarak, yağlı bir balık olan uskumrudan elde edilen kıymaların doğal antioksidan ve antimikrobiyel içeriği yüksek katkıları uygulanarak dondurulması, depolama sırasında kalite özelliklerinin daha uzun süre korunmasında etkili olmuştur. Elde edilen sonuçlar ÜÇE ve NKE ilavesinin uskumru kıymalarında daha iyi bir koruma sağladığını göstermiştir.



Şekil 4. Bitkisel ekstraktlarla muamele edilen uskumru kıymasının depolama süresinin başında (0.gün) (a) ve 6 ay dondurularak depolanması sonrası (b) duyuşal değerlendirme sonuçları

a-d: İlgili özellikte, farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($P<0.01$)

Figure 4. Results of sensory evaluation of mackerel mince applied with different plant extracts at the beginning of the storage (day 0)(a) and after 6 months (b) frozen storage a-d: Different letters on the bar within the same attributes denote the significant differences ($P<0.01$).

KAYNAKLAR

1. Sikorski ZE, Kolakowska A, Burt JR. 1990. Post-harvest biochemical and microbial changes. In: *Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation*. Sikorski ZE (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 55-75.
2. Haard NF. 1992. Technological aspects of extending prime quality of seafood: A Review. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 1(3/4), 9-27.

3. Ünlütürk A, Turantaş F. 1998. *Gıda Mikrobiyolojisi*. Mengi Tan Basımevi, İzmir.

4. Deng JC, Matthews RF, Watson CM. 1977. Effect of chemical and physical treatments on rancidity development of frozen mullet (*Mugil cephalus*) filets. *J. Food Sci.*, 42, 344-347.

5. Boyd LC, Green DP, Giesbrecht FB, King MF. 1993. Inhibition of oxidative rancidity in frozen cooked fish flakes by tertbutylhydroquinone and rosemary extract. *J. Sci. Food Agric.*, 61, 87-93.

6. Soyer A, Şahin ME. 1999. Effect of glazing and storage time on lipid oxidation of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 23, 575-584.

7. Wu JM, Lee MH, Ho CT, Chang SS. 1982. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 59(8); 339-345.

8. Lindberg Madsen H, Bertelsen G. 1995. Spices as antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 271-278.

9. Pazos M, Gallardo JM, Torres JL, Medina I. 2005a. Activity of grape polyphenol as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chem.*, 92, 547-557.

10. Pazos M, González MJ, Gallardo JM, Torres JL. 2005b. Preservation of the endogenous antioxidant system of fish muscle by grape polyphenols during frozen storage. *Eur. Food Res. Technol.*, 220, 514-519.

11. Sánchez-Alonso I, Jimenez-Escrig A, Saura-Calixto F, Borderias AJ. 2007. Effect of grape antioxidant dietary fibre on the prevention of lipid oxidation in minced fish: Evaluation by different methodologies. *Food Chem.*, 101, 372-378.

12. Alghazeer R, Saeed S, Howell NK. 2008. Aldehyde formation in frozen mackerel (*Scomber scombrus*) in the presence and absence of instant green tea. *Food Chem.*, 108, 801-810.

13. Gökoğlu N, Yerlikaya P. 2008. Inhibition effects of grape seed extracts on melanosis formation in shrimp (*Parapenaeus longirostris*). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43, 1004-1008

14. Abdel Moneim AE, Dkhil MA, Al-Quraishy S. 2011. Studies on the effect of pomegranate (*Punica granatum*) juice and peel on liver and kidney in adult male rats. *J. Med. Plants Res.*, 5 (20), 5083-5088.

15. Yehia HM, Elkhadragy MF, and Abdel Moneim AE. 2011. Antimicrobial activity of pomegranate rind peel extracts. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 3664-3668.
16. Basiri S, Shekarforoush SS, Aminlari M, Abhari Kh, Berizi E. 2014. Influence of combined vacuum packaging and pomegranate peel extract on shelf life and overall quality of pacific white shrimp (*Peneus vannamei*) during refrigerated storage. *Iranian J. Vet. Res.*, 15(46), 23-29.
17. Naveena BM, Sen AR, Kingsly RP, Singh DB, Kondaiah N. 2008. Antioxidant activity of pomegranate rind powder extract in cooked chicken patties. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43, 1807-1812.
18. Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.*, 16, 144-158.
19. Anon 1998. Bacteriological Analytical Manual. 8th edn, A.O.A.C. International, Gaithersburg, MD.
20. Goulas A, Kontominas MG. 2005. Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chem.*, 93, 511-520.
21. Boland FE, Paige DD. 1971. Collaborative study of a method for the determination of trimethylamine nitrogen in fish. *J. AOAC Int.*, 54(3); 725-727.
22. Eymard S, Baron CP, Jacobsen C. 2009. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chem.*, 114, 57-65.
23. Steel RGD. 1980. Principle and Procedures of Statistic: A Biometrical Approach. McGraw-Hill Text, New York, 481 p.
24. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (ed). 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1st ed., vol. 2, Williams and Wilkins. Baltimore.
25. Mielnik MB, Olsen E, Vogt V, Adeline D, Skrede G. 2006. Grape seed extract as antioxidant in cooked, cold stored turkey meat. *LWT Food Sci. Technol.*, 41, 42-50.
26. Kanatt SR, Chander R, Sharma A. 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 45, 216-222.
27. Qin YY, Zhang ZH, Li L, Xiong W, Shi JY, Zhao, TR, Fan J. 2013. Antioxidant effect of pomegranate rind powder extract, pomegranate juice, and pomegranate seed powder extract as antioxidants in raw ground pork meat. *Food Sci. Biotechnol.*, 22 (4), 1063-1069.
28. Özoğul Y, Uçar Y. 2013. The effects of natural extracts on the quality changes of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*) burgers. *Food Bioprocess Technol.*, 6, 1550-1560.
29. Uljas HE, Ingham SC. 1999. Combinations of intervention treatments resulting in 5-log-unit reductions in numbers of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium DT 104 organisms in apple cider. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 1924-1929
30. Conner DF, Beuchat LR. 1984 Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, 49, 429-434.
31. Hao YY, Brackett RE, Doyle MP. 1998. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *J. Food Microbiol.*, 15, 367-378.
32. Fagan JD, Gormley TR, Mhuircheartaigh MU. 2003. Effect of freeze-chilling, in comparison with fresh, chilling and freezing, on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 36, 647-655.
33. Özoğul Y, Durmuş M, Balıkcı E, Özoğul F, Ayas D, Yazgan H. 2011. The effects of combination combination of freezing and the use of natural antioxidant technology on the quality of frozen sardine fillets (*Sardinella aurita*). *Int J. Food Sci. Technol.*, 46, 236-242.
34. Ababouch LH, Souibri L, Rhaliby K, Ouahdi O, Battal M, Busta FF. 1996. Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiol.*, 13 (2), 123-132.
35. Nikelson JT, Sinskey AJ. 1972. Microbiology of Food Processing. American Elsevier Publishing Company. New York - Amsterdam - London, 152 p.
36. Kundakçı A. 1989. Kefal ve Lüferin Ön Bekleme Koşullarının Kaliteye Etkileri. *E.Ü. Su Ürünleri Fak. Dergisi*, 6, 23-24.

37. Lee BJ, Hendricks DG, Cornforth DP. 1999. A comparison of carnosine and ascorbic acid on colour and lipid stability in a ground beef patties model system. *Meat Sci.*, 51, 245-253.
38. Sanchez-Alonso I, Jimenez-Escigir A, Saura-Calixto F, Borderias AJ. 2008. Antioxidant protection of white grape pomace on restructured fish products during frozen storage. *LWT-Food Sci. Technol.*, 41, 42-50.
39. Sánchez-Alonso I, Borderias AJ. 2008. Technological effect of red grape antioxidant dietary fibre added to minced fish muscle. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 43, 1009-1018
40. Brannan R. 2008. Effect of grape seed extract on physicochemical properties of ground, salted, chicken thigh meat during refrigerated storage at different relative humidity levels. *J Food Sci.*, 73 (1), 36-40.

LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SYNTHETIC ANTIOXIDANT CONTENT OF SOME VEGETABLE OILS PRODUCED IN TURKEY

Hasan Çabuk*

Bülent Ecevit University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Chemistry, Zonguldak, Turkey

Received / Geliş Tarihi: 17.05.2016

Received in revised form / Düzeltilek Geliş Tarihi 06.06.2016

Accepted / Kabul Tarihi 10.06.2016

Abstract

In this work, the synthetic antioxidant contents of some vegetable oils produced in Turkey were determined by using liquid chromatography with ultraviolet detector. Butylated hydroxy anisole, butylated hydroxy toluene, and *tert*-butyl hydroquinone were the synthetic antioxidants selected. The extraction of antioxidants from oil samples was carried out with vortex-assisted liquid-liquid microextraction prior to chromatographic analysis. Some parameters that affect the extraction efficiency, such as the type of extraction solvent, the volume of solvent, and extraction time were optimized. Under the optimized conditions, the limits of detection and limits of quantification for the antioxidants were in the ranges 0.12-0.28 µg/g and 0.40-0.92 µg/g, respectively. The intra-day and inter-days precisions were calculated in terms of relative standard deviation and found to be less than 6.5% and 8.4%, respectively. Totally, 16 vegetable oil samples produced in Turkey were analyzed to detect the presence of the synthetic antioxidants and the concentrations of antioxidants in samples were found below the maximum permitted levels defined in Turkish Food Codex Regulation.

Keywords: Synthetic antioxidants, vegetable oils, microextraction, liquid chromatography.

TÜRKİYE'DE ÜRETİLEN BAZI BİTKİSEL SIVI YAĞLARIN SENTETİK ANTIOKSİDAN İÇERİKLERİNİN SIVI KROMATOGRAFİSİ İLE BELİRLENMESİ

Özet

Bu çalışmada, Türkiye'de üretilen bazı bitkisel sıvı yağların sentetik antioksidan içerikleri ultraviyole detektörlü sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir. Butil hidroksi anisol, butil hidroksi toluen ve *tert*-butil hidrokinon seçilen antioksidanlardır. Kromatografik analiz öncesinde yağ örneklerindeki antioksidanların ekstraksiyonu vorteks-karıştırma destekli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon tekniği ile yapılmıştır. Ekstraksiyon çözücüsünün türü, çözücü hacmi ve ekstraksiyon süresi gibi ekstraksiyon verimini etkileyen bazı parametreler optimize edilmiştir. Optimize edilen koşullarda antioksidanlar için metodun algılama ve belirleme sınırlarının sırasıyla 0.12-0.28 µg/g ve 0.40-0.92 µg/g aralığında olduğu tespit edilmiştir. Gün içi ve günler arası kesinlik, bağıl standart sapma olarak hesaplanmış ve sırasıyla % 6.5 ve % 8.4'den daha düşük bulunmuştur. Türkiye'de üretilen toplam 16 bitkisel yağ örneği sentetik antioksidanların varlığını tespit etmek için analiz edilmiş ve örneklerdeki antioksidanların konsantrasyonlarının Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde tanımlanan maksimum izin verilen seviyelerin altında kaldığı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Sentetik antioksidanlar, bitkisel yağlar, mikroekstraksiyon, sıvı kromatografisi.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ cabukhasan@hotmail.com,

☎ (+90) 372 257 4010/ 1920,

☎ (+90) 372 257 4181

INTRODUCTION

Synthetic antioxidants (SAs) have been widely used for many years as antioxidants to preserve and stabilize the freshness, nutritive value, flavour and colour of foods and animal feed products (1). Butylated hydroxy toluene (BHT), butylated hydroxy anisole (BHA), tert-butyl hydroquinone (TBHQ) and propyl gallate (PG) are the most commonly used SPAs because of their chemical stability, low cost and availability (2). In several countries, the use of these antioxidants is regulated by various legislating authorities such as European Union Directives and Regulations, the FDA in the United States, Food Standards Australia New Zealand for Australia and New Zealand, Joint FAO/WHO Expert committee on food additives (3). According to Turkish Food Codex, in compliance with European Union Directives, the antioxidants mentioned above are permitted for use, individually or in combination, in oils, fats and lipid containing foods usually at concentrations up to 100 – 200 mg/ kg (4). The SPAs provide a high level of protection in maintaining food product quality but an excess of antioxidants is a health risk, since they may cause allergen reactions, including asthma and hives, in sensitive subjects (5). BHA and BHT have been suspected of being responsible for liver damage, and carcinogenesis when used at high levels in laboratory animals (6). However, there is no clear evidence that SAs intake might cause cancer among humans. Although SPAs are considered safe for human health at recommended doses, the concentration of these compounds in foods is strictly regulated by governments and requires monitoring.

Several analytical methods are available for the determination of SAs. These include liquid chromatography (LC) (7-9), gas chromatography (10-12), and micellar electrokinetic chromatography (13, 14). LC with UV is the most used technique (3). Prior to chromatographic analysis, the classical liquid-liquid extraction (LLE) (7, 15) and solid-phase extraction (SPE) (16, 17) are the most commonly used techniques for the preconcentration and cleanup of SPAs. Recently, some microextraction techniques, such as dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) (8), vortex-assisted liquid-liquid microextraction (VALLME) (9) and ultrasonic-assisted liquid-liquid microextraction (UALLME) (10) were introduced as the simple,

low cost, fast, and environmental-friendly enrichment techniques.

Herein, an optimized and validated LC-UV method for the determination of SAs in some selected vegetable oils consumed in Turkey has been presented. SAs in vegetable oils were extracted with only 500 µL ethanol and then injected into LC-UV directly without clean-up or preconcentration, and the analytes were readily and sensitively detected. The best extraction and analysis conditions for the SAs were optimized and validated in relation to the following figures of merit: accuracy, precision, detection and quantification limits, linearity, and sensitivity. Finally, the methodology was applied to the analysis of vegetable oils obtained from local markets in Zonguldak, Turkey.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and solutions

All of the reagents used in the experiments were of analytical grade. Butylated hydroxy toluene (BHT) was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Butylated hydroxy anisole (BHA) and tert-butyl hydroquinone (TBHQ) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). HPLC grade acetonitrile were also obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Acetone, methanol, and ethanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified with a Direct-Q3 water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The stock solutions of the antioxidants (1000 µg/mL) were prepared by dissolving each individual standard of antioxidants in acetonitrile and stored at 4°C. Working solutions were obtained by appropriate dilution of the stock standard solutions. Total 16 vegetable oil samples including sunflower, virgin olive, refined olive, and corn oil were collected from local supermarkets in Zonguldak, Turkey during a period of January to March in 2016. The collected oil samples were packed in screw-cap glass tubes and stored at room temperature until analyzed.

Instrumentation and chromatographic conditions

The chromatographic analysis was performed by Thermo Finnigan LC system (San Jose, USA) consisting of a P1000 pump, a AS3000 automatic

injector system, a SCM 1000 degasser and a UV1000 UV detector. Separation was performed by means of a Phenomenex Fusion-RP column (250x4.6 mm i.d., 4.0 μ m) protected by a C12 guard column (4x3 mm i.d., Phenomenex). A gradient elution program was optimized by using the mobile phases of acetonitrile and distilled deionized water (0.1% trifluoroacetic acid). The separation was performed at room temperature with a constant flow-rate of 1.0 mL/min by employing the elution program as follows; 0–2 min acetonitrile–water 30:70 (v/v) and then a linear gradient elution from 30% acetonitrile at 2 min to 100% acetonitrile at 15 min, followed by isocratic elution with acetonitrile for 5 min. Finally, 10 min was necessary in re-establishing the initial conditions. The UV detector was set at 280 nm. A vortex shaker (Velp Scientifica, Milan, Italy) and a NF 200 centrifuge (Nüve, Ankara, Turkey) were used in the sample preparation step.

Extraction procedure

Oil samples (1g) were weighed into a 12 mL screw-cap glass test tube. Ethanol (500 μ L) was added, and the mixture was then vigorously shaken on a vortex agitator at 3000 rpm for 3 min. The mixture was next centrifuged at 3500 rpm for 3 min. The upper clear portion was removed with a micro-syringe and 20 μ L of this solution was injected into the LC by using an automatic injector.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of the extraction conditions

In order to improve extraction efficiency, several parameters were studied and optimized, such as the type of extraction solvent, the volume of solvent, and the extraction time. Optimization of vortex-assisted microextraction was carried out by using sunflower oil sample which was free of the analytes. The samples were spiked with the all SAs at a concentration of 25 μ g/g each by adding minute volume (25 μ L) of standard solution in acetonitrile. Spiked samples were vortex mixed for a few seconds and left to stand for 30 min at room temperature for equilibration between analyte and matrix. The optimal conditions were selected based on the peak areas obtained. All the experiments were carried out in triplicate.

The selection of an appropriate extraction solvent is a crucial parameter for a liquid-liquid extraction

process. The extraction solvent has to meet the following requirements such as (a) good chromatographic behavior at optimized LC conditions, (b) low solubility in oil, and (c) high extraction capability for target compounds. In some preliminary studies, it has been reported that acetonitrile, methanol, ethanol or their different mixtures were suitable for extracting phenolic antioxidants from fats (10, 11). Based on these criteria, three extraction solvents including acetonitrile, methanol and ethanol were studied for the extraction of the SAs. A series of experiments were performed by using 500 μ L of the selected extraction solvents and 1 min of vortex mixing time. The results shown in Fig. 1, indicated that ethanol provided the best analytical response among the other solvents; therefore, ethanol was selected as the suitable extracting solvent for subsequent experiments.

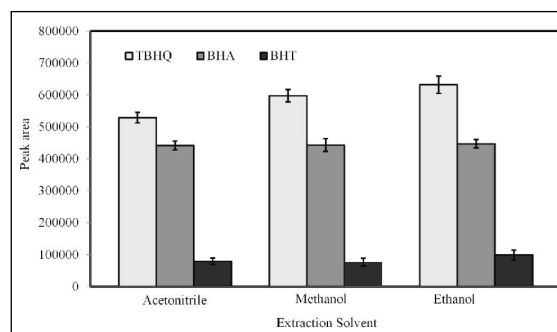


Fig. 1. Effect of type of extraction solvent. Extraction solvent volume, 500 μ L; sample volume, 1 g; vortex mixing time, 1 min; spiked concentration, 25 μ g/g.

In order to examine the effect of the extraction solvent volume, experiments were conducted in which the ethanol volume was varied in the range of 400 – 800 μ L and the vortex mixing time fixed at 1 min. The obtained results are presented in Fig. 2. With the increase of the extraction solvent volume from 400 μ L to 800 μ L, the final organic phase increased, resulting in a decrease of peak response due to the dilution effect. In addition, 400 μ L of extraction solvent resulted in less floating volume after centrifugation and led to collection difficulties. Therefore, 500 μ L of ethanol was selected as the volume of extracting solvent.

The effect of the extraction time was examined under the constant experimental conditions. Following the addition of 500 μ L ethanol, the sample solution was shaken by a vortex mixer (at a maximum vibration motion of 3000 rpm) for a series of extraction times in the range of 0–8

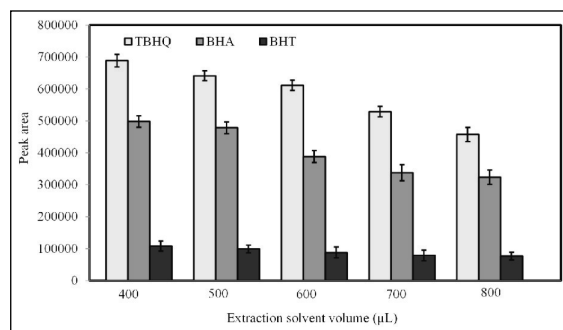


Fig. 2. Effect of volume of extraction solvent. Extraction solvent, ethanol; sample volume, 1 g; vortex mixing time, 1 min; spiked concentration, 25 µg/g.

min. The experimental results are presented in Fig.3. Lower efficiency was obtained when manual shaking was employed for a few seconds (0 min). The results showed that by increasing the vortex time, the extraction efficiency increased, reaching the maximum value at 3 min, and remaining constant after that. Thus, a vortex mixing time of 3 min at 3000 rpm was chosen as the optimal extraction time.

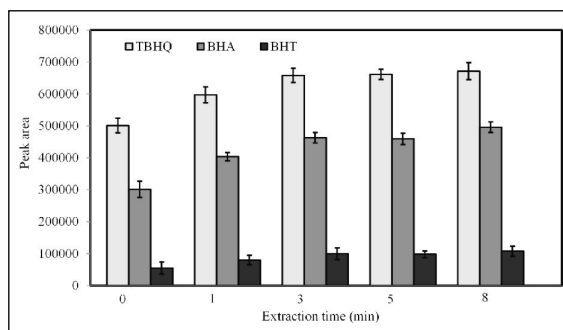


Fig. 3. Effect of extraction time. Extraction solvent, ethanol; extraction solvent volume, 500 µL; sample volume, 1 g; spiked concentration, 25 µg/g.

Method performance

Under the optimal experimental conditions, a series of experiments were performed for obtaining linear ranges, precision, and the limits of detection

(LODs) and quantification (LOQs). The results are summarized in Table 1. The calibration curves were constructed by plotting the peak areas measured versus the concentrations of analytes in the samples. Linearity was observed in the range of 0.5 - 400 µg/g, with the square of correlation coefficients (r^2) ranging from 0.9992 to 0.9997. The LODs and LOQs were calculated, for each analyte, on the basis, respectively, of 3 and 10 times the concentration corresponding to the standard deviation of the signal obtained from six independent complete analyses of the blank sample. LODs ranged from 0.12 to 0.28 µg/g. The precision was evaluated by investigating the intra-day and inter-days precisions. For this purpose, oil samples spiked at a concentration level of 25 µg/g were analyzed five times in the same day (intra-day) and in the four consecutive days (inter-days). The relative standard deviations (RSDs) were satisfactory, remaining below 6.5% (intra-day) and 8.4% (inter-days) for all compounds.

As no certified reference materials for SAs in oil were available, recovery experiments were performed at spiked concentration levels of 25 µg/g and 100 µg/g by adding standard solution into oil samples. Recoveries were between 84–112% and 87–105% for the low and the high spiked levels, respectively. Fig. 4 shows the LC-UV chromatograms of SAs at the concentration level of 25 µg/g in sunflower oil and refined olive oil sample before and after spiking.

Analysis of commercial vegetable oils

The validated method was applied to detect the presence of the SAs in vegetable oils (sunflower, olive and corn oils) produced in Turkey by different companies. Totally, 16 vegetable oil samples were purchased from local supermarkets in Zonguldak and analyzed according to the procedure described above. Some of the SAs were found in seven of the samples, as shown in Table 2. TBHQ remained

Table 1. Analytical performance of the method for the determination of synthetic antioxidants in vegetable oil samples.

Analyte	LR ^a	r^{2b}	LOD ^c	LOQ ^d	RSD % ^e	RSD % ^f
TBHQ	0.5 – 400	0.9992	0.12	0.40	4.3	5.2
BHA	0.5 – 400	0.9997	0.14	0.48	3.2	4.8
BHT	1 – 400	0.9995	0.28	0.92	6.5	8.4

^aLinear range (µg/g).

^bSquare of correlation coefficient.

^cLimit of detection (µg/g, S/N = 3).

^dLimit of quantification (µg/g, S/N = 10).

^eIntra-day relative standard deviation (C = 25 µg/g, n = 5).

^fInter-days relative standard deviation (C = 25 µg/g, n = 4).

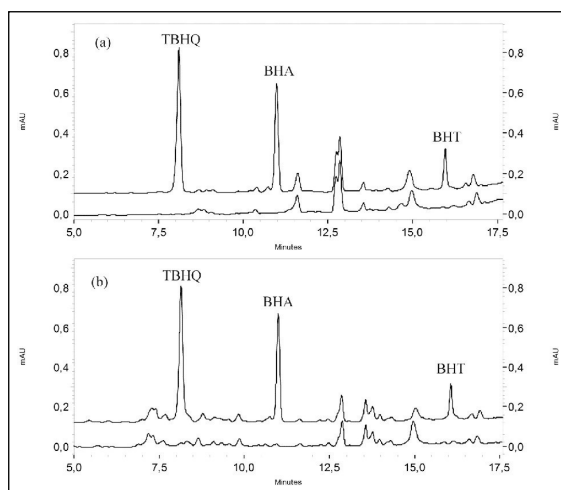


Fig. 4. LC-UV chromatograms of SAs at the concentration level of 25 µg/g in (a) sunflower oil and (b) refined olive oil sample before and after spiking.

under quantification limit of the method in all samples, whereas concentrations up to 3.48 µg/g for BHA and 3.87 µg/g for BHT were found in some of the samples. In most cases, BHA and BHT were found at concentration levels near the quantification limits. All the concentrations found for SAs were far below the maximum permitted levels defined in Turkish Food Codex Regulation (4).

CONCLUSIONS

In this study, an optimized and validated vortex-assisted liquid-liquid microextraction method combined with LC-UV has been proposed for the

determination of synthetic antioxidant in vegetable oil samples. The method provided satisfactory validation parameters in terms of linearity, accuracy, precision and sensitivity, requiring only 500 µL of organic solvent per sample. Finally, this method was applied for monitoring of SAs in same selected vegetable oils produced in Turkey. TBHQ was not detected in any of samples. Although BHA and BHT were found in some samples, their levels were far below the maximum permitted levels defined in Turkish Food Codex Regulation.

REFERENCES

- Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. 1999. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem Toxicol*, 37, 1027-1038.
- Yang MH, Lin HJ, Choong YM. 2002. A rapid gas chromatographic method for direct determination of BHA, BHT and TBHQ in edible oils and fats. *Food Res Int*, 35, 627-633.
- Andre C, Castanheira I, Cruz JM, Paseiro P, Sanches-Silva A. 2010. Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. *Trends Food Sci Tech*, 21, 229-246.
- Turkish Food Codex. 2011. Ministry of Food Agriculture and Livestock, Republic of Turkey, Publication No: 2011/ 28157.
- Simon RA. 2003. Adverse reactions to food additives. *Curr Allergy Asthma Rep*, 3, 62-66.

Table 2. Synthetic antioxidant contents of commercial vegetable oils.

Oil Sample	Concentration of antioxidants ± SD (µg/g)		
	TBHQ	BHA	BHT
Sunflower-1	nd	1.56 ± 0.21	1.15 ± 0.15
Sunflower-2	nd	0.76 ± 0.10	3.63 ± 0.53
Sunflower-3	nd	nd	nd
Sunflower-4	nd	3.48 ± 0.35	nd
Sunflower-5	nd	nd	nd
Sunflower-6	nd	nd	nd
Sunflower-7	nd	nd	nd
Sunflower-8	nd	2.18 ± 0.18	2.17 ± 0.32
Virgin Olive-1	nd	nd	nd
Virgin Olive-2	nd	nd	nd
Refined Olive-1	nd	nd	nd
Refined Olive-2	nd	3.61 ± 0.40	nd
Refined Olive-3	nd	nd	nd
Corn-1	nd	0.85 ± 0.10	3.87 ± 0.40
Corn-2	nd	3.46 ± 0.43	nd
Corn-3	nd	nd	nd

nd: Not detectable.

SD: Standard deviation (n=3).

6. Shahidi F, Ambigaipalan P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects: a review. *J funct foods*,18, 820-897.
7. Perrin C, Meyer L. 2002. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in dry foods by reversed-phase HPLC with photodiode array detection. *Food Chem*, 77, 93-100.
8. Biparva P, Ehsani M, Hadjmohammadi MR. 2012. Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. *J Food Comp Anal*, 27, 87-94.
9. Amlashi NE, Hadjmohammadi MR, Nazari SSSJ. 2014. Water-contained surfactant-based vortex-assisted microextraction method combined with liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants from edible oil. *J Chromatogr A*, 1361, 9-15.
10. Ding M, Zou J. 2012. Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. *Food Chem*, 131, 1051-1055.
11. Cacho JI, Campillo N, Vinas P, Hernandez-Cordoba M. 2016. Determination of synthetic phenolic antioxidants in edible oils using microvial insert large volume injection gas-chromatography. *Food Chem*, 200, 249-254.
12. Farajzadeh MA, Mogaddam MRA. 2016. Low-density-solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography with flame ionization detection for the determination of synthetic phenolic antioxidants in milk samples. *J Sep Sci*, 39, 1160-1167.
13. Guan Y, Chu Q, Fu L, Wu T, Ye J. Determination of phenolic antioxidants by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection. *Food Chem*, 94, 157-162.
14. Delgado-Zamarreno MM, Gonzalez-Maza I, Sanchez-Perez A, Martinez RC. 2007. Analysis of synthetic phenolic antioxidants in edible oils by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Chem*, 100, 1722-1727.
15. Soliman, MA, Pedersen JA, Suffet IH. 2004. Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *J Chromatogr A*, 1029, 223-237.
16. Fries E, Püttmann W. Analysis of the antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT) in water by means of solid phase extraction combined with GC/MS. *Water Res*, 36, 2319-2327.
17. Rodil R, Quintana JB, Basaglia G, Pietrogrande MC, Cela R. 2010. Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1217, 6428-6435.

EFFECT OF BAKING AND FRYING METHODS ON QUALITY CHARACTERISTICS OF POTATO CHIPS

Sezin Tuta^{1*}, T. Koray Palazoğlu²

¹Çankırı Karatekin University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Çankırı, Turkey

²University of Mersin, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Mersin, Turkey

Received / Geliş Tarihi: 25.04.2016

Received in revised form / Düzeltilek Geliş Tarihi 14.06.2016

Accepted / Kabul Tarihi 17.06.2016

Abstract

Effect of cooking method (baking and frying) on quality attributes of potato chips was investigated in this study. Baking and frying experiments were conducted at 170, 180, 190°C using potato slices with a thickness of 1.4 mm. Texture and color measurements were carried out and surface and internal temperatures of potato slices were monitored during the experiments. F_{max} values of potato chips were found around 2.5 N for both treatments, deformation values of baked samples (0.91 mm at 170°C, 0.65 mm at 180°C 1.14 mm for 190°C) were lower than fried ones (1.77 mm at 170°C, 1.09 mm at 180°C, 2.24 mm for 190°C). Hardness values of baked samples (3.90 N/mm at 170°C, 3.17 N/mm at 180°C, 2.33 N/mm at 190°C) were higher than fried ones (1.88 N/mm at 170°C, 2.85 N/mm at 180°C, 0.99 N/mm for 190°C). Colors of fried and baked potato chips were orange yellow and brilliant yellow, total color changes were determined in the range of 16.7 - 22.3 and 21.7 - 37.4, respectively. The results showed that baking process failed to provide acceptable quality attributes although it is considered as healthy alternative to frying due to its potential to provide texture and color with existence of less oil.

Keywords: Potato chips, frying, baking, quality properties

KIZARTMA VE FIRINLAMA YÖNTEMLERİNİN PATATES ÇİPSLERİNİN KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Özet

Bu çalışmada patates cipsi üretiminde kullanılan kızartma ve fırınlama yöntemlerinin patates cipsinin kalite özellikleri olan rengi ve tekstürü üzerine etkisi incelenmiştir. Fırınlama ve kızartma işlemleri belirli kalınlıktaki (1.4 ± 0.1 mm) patates dilimlerine 170, 180 ve 190°C'de uygulanmıştır. Kızartma ve fırınlama işlemi süresince patates cipslerinin iç kısmı ve yüzey sıcaklıklarındaki değişimi ölçülmüş ve sonrasında tekstür ve renk ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deformasyon değerleri, fırınlanan örneklerin (0,91 mm, 170°C; 0,65 mm, 180°C; 1,14 mm, 190°C) kızartılmış örneklerden (1,77 mm, 170°C; 1,09 mm, 180°C; 2,24 mm, 190°C) düşük, sertlik değerleri fırınlanan örneklerin (3,90 N/mm, 170°C; 3,17 N/mm, 180°C; 2,33 N/mm, 190°C) kızartılmış örneklerden (1,88 N/mm, 170°C; 2,85 N/mm, 180°C; 0,99 N/mm, 190°C) yüksek ve F_{max} değerlerinin her iki örnek için benzer olduğu görülmüştür. Renk değerleri incelendiğinde fırınlanmış örnekler turuncumsu sarı, kızarmış örnekler parlak sarı olarak tanımlanmış ve toplam renk değişimin kızarmış ürünlerde 16,7 - 22,3, fırınlanmış örneklerde ise 21,7 - 37,4 aralığında olduğu görülmüştür. Sonuçlar, daha az yağ kullanılması nedeni ile sağlıklı bir pişirme yöntemi olarak önerilen fırınlama işleminin patates cipsi üretiminde arzu edilmeyen tekstür ve renk oluşumuna neden olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Patates cipsi, kızartma, fırınlama, kalite özellikleri

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author;*

✉ sezintuta@karatekin.edu.tr,

© (+90) 376 218 9500,

☎ (+90) 376) 218 9536

INTRODUCTION

Potato chips are popular for their unique characteristics such as flavor and crispy texture. However, due to their oil content ranging from 35% to 45% by weight (1), they have a negatively perceived image. Furthermore, among the foods tested up to date, potato chips appear to have the highest levels of acrylamide (2, 3). In recent years, increasing consumer awareness of the relationship between nutrition and health has led to demand for high quality foods that are also healthy. Therefore, making potato chips with low oil and acrylamide content and good sensory quality has been a great interest to researchers. Impingement drying (4, 5), vacuum frying (1, 6), low-pressure superheated steam drying (7, 8), and baking are the prominent methods that have been studied. Among these methods, baking is considered as a viable alternative to frying due to its potential to provide a similar product with no added fat (9), and baked version of potato chips has been marketed by several manufacturers.

The characteristic crispy texture of potato chips is one of the most important quality indicators of the finished product, and is the result of changes in the original structure of potato tissue during heating. Development of this crispy texture is highly related to the rate of heat transfer. Deep fat frying can impart this characteristic thanks to the high rate of heat transfer associated with hot frying oil. Rapid escape of water from potato slices as a result of high heat transfer rates during frying is responsible for the expanded and crispy texture (10, 11). Low rate of heat transfer associated with baking leads to slow cooking and hence long processing times, and fails to provide the desired expanded texture and crispiness desired by consumers.

In addition to the changes related to texture, color changes also take place during both cooking methods. Color of fried potato products is described as one of the most significant quality factors determining their acceptance (12-14). A strong relationship was also reported between color development and drying rate (15). Although baking is a healthier alternative to frying, it fails to provide quality attributes similar to that of fried chips; therefore objective of this study was to investigate the effect of cooking method (baking and frying) on quality attributes (texture and color) of potato chips.

MATERIALS and METHODS

Materials

Potatoes (Lady Claire) were provided Anka Tohumculuk, Nevsehir, Turkiye. Potato slices were prepared as explained in (8). Firstly, potatoes were cut into thin slices (1.4 ± 0.1 mm) using an electric slicer (GE300, Celme, Italy) and then circular slices with a diameter of 36 mm were cut out using a plastic cutting mold. Slices were washed for 1 min in distilled water using a magnetic stirrer to remove surface starch. Then, the slices were gently dried with paper towel.

Frying and Baking Experiments

Potato slices (2 slices at a time) were fried in an electrical fryer (Precisterm, J.P. Selecta, Spain) at 170, 180 and 190°C by immersing in sun flower oil (5 L) completely. For baking experiments, potato slices were coated with sunflower oil and oil-coated slices (2 slices at a time) were placed on a stainless steel wire mesh inside the oven (ULP600, Memmert, Germany) so that drying could take place from both sides. Frying and baking times at different temperatures were selected as to reach a final moisture content of less than 2% by weight. Frying times were determined 130 s; 110 s; 85 s and baking times were 22 min; 20 min; 16 min for 170, 180, 190°C, respectively. Moisture content of samples was determined by drying the samples to constant weight at $105 \pm 1^\circ\text{C}$ (16).

Temperature Measurement

Temperature measurements were performed as explained (9). Surface and internal temperatures of potato slices were monitored during frying and baking experiments using type-T thermocouples (diameter 0.22 mm, Omega Engineering, Inc., Stamford, Conn., U.S.A.). Time and temperature data were collected every second by using a data acquisition system, comprising a digital multimeter and a 20-channel multiplexer (Keithley, Model 2700 DMM and Model 7700, Cleveland, Ohio, U.S.A.). Surface thermocouple was placed so that the tip of the thermocouple was flushed with the surface. Location of the surface thermocouple was verified by visual observation after each experiment. A second thermocouple was placed inside the slice (toward the center) to measure the internal temperature. Air temperature was recorded using another thermocouple which was

placed 10 cm above the samples. Temperature measurement of the frying oil was performed by immersing a thermocouple in the fryer. Since 2 potato slices were fried at a time, no change in oil temperature was observed. A sudden drop in air temperature was inevitably experienced in baking experiments when the oven door was opened to place the slices inside the oven. It was, however, observed that the temperature inside the oven reached the set temperature within the 1st minute of the baking experiments.

Texture Measurements

Texture measurements were performed using a Texture Analyzer (TA-XT2i, Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK). A crisp fracture rig (HDP/CFS) and a 6.35 mm ball probe (P/0.25S) were used. Tests were carried out by placing the fried or baked potato samples on the rig and by driving perpendicularly a ball probe (6.35 mm) attached to the crosshead at a speed of 1 mm/s. Texture measurements were performed after 2 minutes that potato chips were removed from the frying oil or the baking oven. Two potato chips were analyzed for each frying and baking experiments and repeated five times. From the force-deformation curve the following parameters were obtained; maximum force value (force at the first major drop, F_{max} , N) and deformation value (deformation induced at maximum force, mm), hardness (ratio of maximum force value to deformation value, N/mm).

Color Measurement

Machine vision system was used for color analysis. A color image obtained with a digital camera under controlled and defined illumination conditions (D65 illumination in a light box described by Luzuriaga et. al. (17)) was analyzed using software developed for this purpose. Average color method was used to determine average L^* (lightness), a^* (redness), b^* (yellowness) values for each potato chips. In the average color method, the individual L^* , a^* , and b^* values of each pixel in an object are averaged (18). Ten samples were analyzed for each temperature for baking and frying. Total color difference (ΔE) between raw (L_0 , a_0 , b_0) and fried/baked potato slices (L , a , b) was defined by Equation 1.

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

DSC Analysis

DSC analyses were performed using a Perkin-Elmer DSC-6 differential scanning calorimeter (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA). Nitrogen was used as the purge gas at a flow rate of 20 mL/min. After weighing samples of 5-6 mg into aluminum pans, the pans were hermetically sealed. An empty, hermetically sealed aluminum pan was used as reference. The samples were subjected to a temperature program during which heating took place from 20 to 110°C at a scan rate of 5°C/min.

Statistical Analysis

All the experiments were performed in five replicates for each temperature. The differences in color, texture of baked and fried samples were statistically evaluated by independent sample t-test ($\alpha=0.05$) using SPSS (SPSS for Windows, Release 11.5, 2002, LEAD Technologies Inc.).

RESULTS AND DISCUSSION

Texture of Baked and Fried Potato Chips

Texture parameters (F_{max} , deformation, hardness) of baked and fried potato chips and statistical results were showed in Table 1. Typical force-deformation curve of baked and fried potato chips were depicted for 170°C in Figure 1. Maximum force values of baked and fried potato chips were significantly different only at 180°C ($P<0.05$). F_{max} values of baked and fried potato chips were observed similar and ranged between 2-3 N at all temperatures. This observation was in agreement with the results obtained by (1, 19, 20). Research in the literature showed that cutting force of commercial potato chips is 1.9 N (7). In the light of this observation, baked and fried potato chips could be evaluated as commercial potato chips in terms of maximum force values in the present study.

Deformation values of baked and fried potato chips were significantly different at all temperatures ($P<0.05$). Baked potato chips had lower deformation values for all temperatures and their hardness values, which were obtained by dividing deformation value by maximum force value, are higher than fried samples. The hardness values were significantly different at 170°C and 190°C ($P<0.05$). It was observed that these values

Table 1. Texture parameters of potato chips prepared by frying and baking at 170,180,190°C.

Texture parameter	Temperature (°C)	Frying	Baking	p ($\alpha=0.05$)
F_{\max} (N)	170	2.74 ± 1.04	2.88 ± 0.45	0.692
	180	2.66 ± 0.79	2.02 ± 0.33	0.029
	190	2.02 ± 0.73	2.41 ± 0.67	0.233
Deformation (mm)	170	1.77 ± 0.92	0.91 ± 0.65	0.027
	180	1.09 ± 0.51	0.65 ± 0.10	0.015
	190	2.24 ± 0.87	1.14 ± 0.42	0.002
Hardness (N/mm)	170	1.88 ± 1.06	3.90 ± 1.45	0.002
	180	2.85 ± 1.32	3.17 ± 0.62	0.500
	190	0.99 ± 0.41	2.33 ± 0.86	0.000

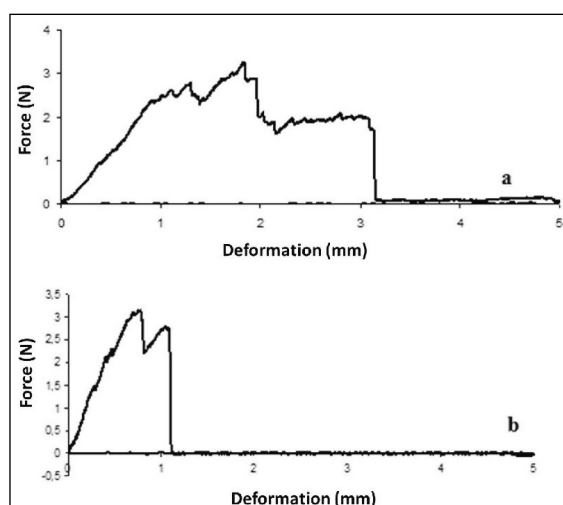


Figure 1. Typical force- deformation curves of baked (a) and fried (b) chips at 170 °C.

of both samples had no differences at 180°C ($P>0.05$). This suggests that texture formation may have been limited due to the termination of treatment. It is therefore presumed that the combined effect of time and temperature on texture formation at 170°C and 190°C was greater than at 180°C as explained in a previous study by (9).

A higher hardness value indicates that material requires a higher force treatment for breaking and this can be explained as brittle. Higher hardness values and sharp vertical drop in force-deformation curve (Figure 1b) demonstrated that baked potato chips were less flexible (more brittle) than fried potato chips. According to the results fried potato chips had more flexible texture than baked ones. In contrast, frying takes place rapidly (due to much higher heat transfer coefficients associated with hot frying oil) and is a much more efficient heat transfer process than baking. Although it has been reported that not all starch may gelatinize in case of rapid dehydration (21, 22),

the DSC analysis revealed that no ungelatinized starch was present within the potato slice after frying at 180°C for 1 min and 40 s in this study. Furthermore, the DSC thermogram of the potato slice fried at 180°C for only 30 s showed no gelatinization peak. From this, it was concluded that although dehydration took place rapidly, all starch was able to gelatinize even within the limited time of frying. In frying process, existence of oil acts as a plasticizer in the system and provides flexibility to the product (21). Limited heat transfer due to the low heat transfer coefficient may not have generated energy requirement for all starch gelatinization during baking process. Many researches in the literature related to harder texture of baked potato chips as incomplete starch gelatinization during baking process (7, 23, 24). This can cause less delamination into the potato chips and tough structure since not occurring intercellular separation.

Although a sensory assessment was not a goal of the study, sensory evaluations were performed in order to supplement instrumental measurements by the authors of this article. As regards visual observations, volume of baked potato chips was smaller than fried ones and had no bubbles. Hardened surface of baked chips may have increased the resistance to volume change that consequently caused more shrinkage of volume during baking process. This may prevent the intercellular separation thus, the bubble formation on the product surface which is formed by gas expansion inside the pores, as explained (1).

Surface and Internal Temperatures

Baking time was longer than frying times probably because the formation of a dry skin that acted as a barrier to heat transfer to the core of potato slices. At the same time low heat transfer coefficient of air may have decreased heat transfer

rate and further it may be lowered moisture loss rate from potato chips as explained by (23, 24).

Temperature profiles during baking and frying processes were depicted for 170°C in Figure 2. Time-temperature profile of the baking process markedly differed from frying. The difference between surface and center temperature was quite high (~50°C) at the beginning of frying process (Figure 2a). In contrary to frying, baked samples internal and surface temperatures increased together and those were 100°C for a long time during baking. It started to rise when drying was completed (Figure 2b). These differences in temperature profiles may have caused because of lack of lamination between layers of potato slice during baking process.

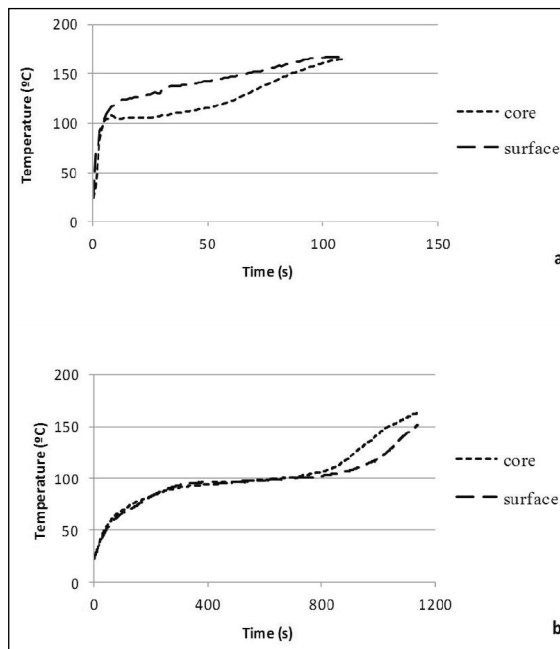


Figure 2. Surface and internal temperature profiles of potato slices during frying (a) and baking (b) at 170°C.

Color of Baked and Fried Potato Chips

Lightness, redness, yellowness (L^* , a^* , b^*) and ΔE values of fried and baked chips were shown in Table 2. Color parameters of baked and fried potato chips were significantly different for all temperatures ($P < 0.05$). Lightness (L^*) and yellowness (b^*) values of baked chips were lower and redness (a^*) values were higher than their fried counterparts. Figure 3 presented the images of baked and fried potato chips at 170, 180, 190°C. Machine vision system determined color of baked and fried potato chips as orange yellow and brilliant yellow, respectively.

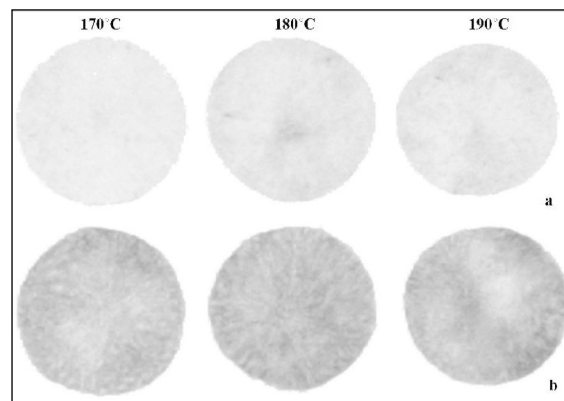


Figure 3. Image of fried (a) and baked (b) potato chips at 170, 180, 190°C.

Colors of baked potato chips were indicated darker than fried ones with respect to the color parameters and image of chips. Total color change (ΔE) gives information about the change of color during process (25, 26). According to the results baked samples had higher ΔE values for all temperatures. Greater change of color during baking can be explained by the formation route of color. Existence of oxygen during baking process

Table 2. Color parameters of potato chips prepared by frying and baking at 170, 180, 190°C.

Color parameter	Temperature (°C)	Frying	Baking	p ($\alpha=0.05$)
L^*	170	93.7 ± 1.9	80.5 ± 2.5	0.000
	180	87.9 ± 3.5	75.3 ± 4.4	0.000
	190	92.2 ± 1.2	83.9 ± 2.8	0.002
a^*	170	-13.4 ± 3.0	8.7 ± 3.3	0.000
	180	-2.1 ± 7.0	20.0 ± 5.7	0.000
	190	-9.9 ± 2.4	4.2 ± 5.5	0.000
b^*	170	61.3 ± 2.2	57.5 ± 2.3	0.000
	180	64.9 ± 1.5	55.0 ± 2.6	0.000
	190	62.6 ± 1.7	57.5 ± 1.5	0.000
ΔE	170	15.7 ± 1.8	26.3 ± 3.3	0.000
	180	22.3 ± 4.4	37.4 ± 6.4	0.000
	190	16.7 ± 1.7	21.7 ± 5.4	0.025

leads to ascorbic acid oxidation in addition to Maillard reaction. Many scientific articles (4, 7, 26, 27) reported that air causes higher degree of ascorbic acid loss because of low convective heat transfer coefficient and existence of oxygen in medium. Since frying medium has no oxygen, color formation occurs only via Maillard reaction. This caused lighter color of chips during frying in present study. Redness (a^*) parameter changed significantly during frying while L^* and b^* values had no significant change as explained by (28). The linear relationship between acrylamide content and a^* value caused by the same formation mechanism, was reported (28, 29). A previous study (9) showed that acrylamide content of baked potato chips was lower than fried ones at 170°C in spite of having a higher value of a^* value. This observation showed that acrylamide content and a^* value may not always be directly related when color formation takes place via both enzymatic and non-enzymatic reactions. Higher a^* and ΔE values were indicated for both baked and fried potato chips at 180°C. This observation might be about limited color formation due to termination of both processes. These results may be better explained by detailed study about time-temperature effects on color formation of potato chips which was beyond scope of this study.

CONCLUSIONS

Baked and fried potato chips were investigated in terms of their color and textural properties. Color parameters of baked and fried potato chips were significantly different and baked chips had darker color for all temperatures. Hardness of these samples showed importance of combined effect of time and temperature on baked chips. According to the results it can be concluded that baking process failed to provide acceptable quality attributes although it is considered as a healthy alternative to frying due to its potential to provide texture and color with existence of less oil. Determining color and texture formation kinetic of potato chips and acrylamide content and using alternative technologies instead of oven baking and the combined effect of some alternative technologies with oven baking could be subject of further research.

ACKNOWLEDGEMENT

Thanks to University of Mersin, Food Engineering Department to perform laboratory activities.

REFERENCES

1. Garayo J, Moreira R. 2002. Vacuum frying of potato chips. *J Food Eng* 55, 181-191.
2. Health Canada. 2012. Health Canada's Revised Exposure Assessment of Acrylamide in Food. www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/food-aliment/acrylamide/rev-eval-exposure-exposition-eng.php. (Accessed 2 March 2016).
3. Ouhitit A, Al-Sharbati M, Gupta I, Al-Farsi Y. 2014. Potato chips and childhood: What does the science say? An unrecognized threat? *Nutrition*, 30(10): 1110-1112.
4. Caixeta AT, Moreira R, Castell-Perez ME. 2002. Impingement drying of potato chips. *J Food Process Eng* 25, 63-90.
5. Moreira RG. 2001. Impingement drying of food using hot air and superheated steam. *J Food Eng* 49, 291-295.
6. Troncoso E, Pedreschi F, Zuniga RN. 2009. Comparative study of physical and sensory properties of pre-treated potato slices during vacuum and atmospheric frying. *J Food Sci Technol* 42, 187-195.
7. Leeratanak N, Devahastin S, Chiewchan N. 2006. Drying kinetics and quality of potato chips undergoing different drying techniques. *J Food Eng* 77, 635-643.
8. Kingcam R, Devahastin S, Chiewchan N. 2008. Effect of starch retrogradation on texture of potato chips produced by low-pressure superheated steam drying. *J Food Eng* 89, 72-79.
9. Palazoglu TK, Savran D, Gokmen V. 2010. Effect of Cooking Method (Baking Compared with Frying) on Acrylamide Level of Potato Chips. *J Food Sci* 75, 25-29.
10. Anand A, 2011. Process for producing baked potato slices with expanded texture. Available from: <http://www.google.com/patents/EP2285238A2?cl=en>. Accessed March 2, 2016.
11. Pandey A, Moreira RG. 2012. Batch vacuum frying system analysis for potato chips. *J Food Process Eng* 35(6), 863-873.

12. Krokida MK, Oreopoulou ZB, Maroulis ZB, Marino-Kouris D. 2001. Colour changes during deep fat frying. *J Food Eng* 48, 219-225.
13. Nourian F, Ramaswamy HS, Kushalappa AC. 2003. Kinetics of quality change associated with potatoes stored at different temperatures. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36, 49-65.
14. Kotsiou K, Tasioula-Margarita M, Fiore A, Gökmen V, Fogliano V. 2013. Acrylamide formation and colour development in low-fat baked potato products as influenced by baking conditions and oil type. *Eur Food Res Technol.* 236 (5):843-85.
15. Pedreschi F, Zuniga RN. 2009. Acrylamide and oil reduction in Fried potatoes: A review. *Global Science Books Food 3 (Special Issue 2)*, 82-92.
16. AOAC Assn. of Official Analytical Chemists. 1975. Official methods of analysis. 12th ed. Washington, D.C.: AOAC.
17. Luzuriaga D, Balaban MO, Yeralan S. 1997. Analysis of visual quality attributes of white shrimp by machine vision. *J Food Sci*, 62(1), 1-7.
18. Balaban MO. 2008. Quantifying nonhomogeneous colors in agricultural materials Part 1: Method development. *J Food Sci*, 73(9), 431-437.
19. Salvador A, Varela P, Sanz T, Fiszman SM. 2009. Understanding potato chips crispy texture by simultaneous fracture and acoustic measurements, and sensory analysis. *LWT - Food Sci Technol* 42, 763-767.
20. Segnini, S., Dejmek, P., Öste, R. 1999. Relationship between instrumental and sensory analysis of texture and color of potato chips. *J Texture Studies*, 30, 677-690.
21. Skarra LL, Murty AS, Evans JR. 1988. Food shell and method of manufacture. Patent number: 4781932.
22. Teruel M, Gordon M, Linares MB, Garrido MD, Ahromrit A, Niranjana K. 2015. A Comparative study of the characteristics of french Fries produced by deep fat frying and air frying. *J Food Sci*, 80(2):349-358.
23. Chiavaro E, Barbanti D, Vittadini E, Massini R. 2006. The effect of different cooking methods on the instrumental quality of potatoes (cv. Agata). *J Food Eng* 77, 169-178.
24. Pimpaporn P, Devahastin S, Chiewcan N. 2007. Effects of combined pretreatments on drying kinetics and quality of potato chips undergoing low-pressure superheated steam drying. *J Food Eng* 81, 318-329.
25. Wilson W D, MacKinnon I M, Jarvis M C. 2002. Transfer of heat and moisture during oven baking of potatoes. *J Sci Food Agric.* 82, 1074-1079.
26. Demiray E, Tulek Y. 2015. Color degradation kinetics of carrot (*daucus carota* l.) slices during hot air drying. *J Food Processing and Preservation*, 39(6):800-805.
27. Haase NU, Weber L. 2003. Ascorbic acid losses during processing of French fries and potato chips. *J Food Eng* 56, 207-209.
28. Khraishes MAM, McMinn WAM., Magee, T. R. A. 2003. Quality and structural changes in starchy foods during microwave and convective drying. *Food Res Int* 37, 497-503.
29. Pedreschi F, Kaack K, Grandby K. 2006. Acrylamide Content and Color Development in Fried Potato Strips. *Food Res Int* 39, 40-46.
30. Romani S, Bacchiocca M, Rocculi P, Rosa DM. 2008. Effect of frying time on acrylamide content and quality aspects of French fries. *Eur Food Res Technol* 226, 555-560.

FARKLI MUMLARLA OLUŞTURULAN OLEOJELLERİN REOLOJİK VE TEKSTÜREL ÖZELLİKLERİ

İlkem Demirkese*

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda Kontrol Genel Müdürlüğü,
Gıda İşletmeleri ve Kodeks Dairesi Başkanlığı, Ankara

Geliş tarihi / Received: 24.05.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 14.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 17.06.2016

Özet

Bu çalışmanın temel amacı, farklı mumların (ayçiçeği, pirinç kepeği ve karnauba) yağ-yapı oluşturma özelliklerinin anlaşılmasını sağlamaktır. Ayçiçeği yağı ile mumların oleojel oluşturma özellikleri reoloji, tekstürel ve katı yağ oranı ölçümleri gibi farklı teknikler kullanılarak değerlendirilmiştir. Ayçiçeği mumu içeren oleojelleri, takiben pirinç kepeği ve karnauba mumu oleojelleri, en yüksek sertlik değerlerini sergilemişlerdir. Öte yandan, en yüksek iç ve dış yapışkanlık özellikleri karnauba mumu oleojellerinden elde edilirken; en düşük iç ve dış yapışkanlık değerleri ayçiçeği mumu oleojellerinde gözlenmiştir. Oleojellerin viskoziteleri sıcaklığın fonksiyonu olarak gözlenmiştir. Arrhenius eşitliğine göre, en yüksek aktivasyon enerjisi (E_a) karnauba mumu oleojellerinden elde edilmiştir. Viskoelastik özelliklerdeki değişim oleojellerin sertlik değerlerindeki değişimle paralellik göstermiştir. En yüksek depolama modülüs ve kayıp modülüs ayçiçeği mumu oleojellerinden elde edilirken, en düşük depolama modülüs ve kayıp modülüs değerleri karnauba mumu oleojellerinde gözlenmiştir. Tüm oleojel örnekleri arasında, karnauba mumu oleojel örneklerinin katı yağ oranı vücut sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta sabit kalmıştır.

Anahtar kelimeler: oleojel, ayçiçeği mumu, pirinç kepeği mumu, karnauba mumu, reology, tekstür, SFC

RHEOLOGICAL AND TEXTURAL CHARACTERISTICS OF OLEOGELS FORMED BY DIFFERENT WAXES

Abstract

The main objective of this study was to understand the oil-structuring properties of different waxes (sunflower, rice bran and carnauba). The formation of oleogels of sunflower oil with waxes was evaluated by using different techniques such as rheological, textural and solid fat content measurements. The oleogels with sunflower exhibited the highest hardness followed by rice bran and carnauba wax oleogels. On the other hand, the most adhesive and cohesive properties were obtained from the carnauba wax oleogel, while the lowest one was observed in sunflower wax oleogel. The viscosities of oleogels were observed as a function of temperature. According to Arrhenius equation, the highest activation energy (E_a) was obtained from carnauba wax oleogel. The changes in viscoelastic properties have been shown to correlate with the changes in hardness values of oleogels. While the highest storage modulus and loss modulus were obtained from sunflower wax oleojel, the lowest storage modulus and loss modulus were observed for carnauba wax oleojel. Among all oleogel samples, SFC of carnauba wax oleogel remained constant at the temperature close to body temperature.

Keywords: Oleogel, sunflower wax, rice bran wax, carnauba wax, rheology, texture, SFC

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ilkem.mert@tarim.gov.tr,

☎ (+90) 312 278 7731,

☎ (+90) 312 278 7760

GİRİŞ

Katı yağlar, gıda endüstrisinde gıdalara fonksiyonel özellikler kazandırmak amacıyla kullanılan önemli bir gıda maddesi grubudur. Gıda ürünlerine istenilen yapısal özellikleri (tekstürel ve stabilize edici özellikler) birincil olarak trans ve doymuş yağlardan meydana gelen koloidal yağ kristal ağ oluşumu kazandırmaktadır (1). Ancak trans ve doymuş yağların tüketiminin sağlık üzerine olumsuz etkilerinden dolayı, farklı devlet kurumlarınca beslenme yönetmeliklerinde gerek çoklu doymuş yağ gerekse trans yağ tüketiminin azaltılması önerilmekte ve dolayısıyla katı yağların diyetlerde doymamış yağlarla ikame edilmesi tavsiye edilmektedir (2). Bu nedenle, pek çok üretici ve araştırmacı doymuş ve trans yağ kullanmadan ve sıvı yağların besinsel profillerini bozmadan sıvı yağların yapısını modifiye ederek gıdalara katı yağların fonksiyonel özelliklerine benzer özellikleri kazandırmayı hedeflemişlerdir (3). Bu amaçla araştırmacıların kullandığı bazı alternatif yeni yapılandırma metotları; yapılandırılan emülsiyon oluşum, interesterifikasyon ve organojelasyon teknikleridir (4).

Organojelasyon son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken sıvı yağlara viskoelastik özelliklerin kazandırıldığı ve sıvı yağların kendi başına stabil, anhidroz (susuz), termodönüşümlü ve üç boyutlu jel yapıları dönüştürüldüğü yeni ve gelişim aşamasında olan bir tekniktir (5, 6). Üç boyutlu jel ağı içerisinde hapsedilmiş organik sıvı olarak tanımlanan oleojellerin gıdalarda kullanımıyla ilgili literatürde kısıtlı sayıda yayın yer almaktadır (3-5, 7-14). Oleojeller sıvı yağ ve organojelatörlerden oluşan çift fazlı yapılar olduğu için oleojellerin fiziksel özellikleri kullanılan organojelatör türü ve miktarına bağlıdır. Sıvı yağlara üç boyutlu jel yapısı kazandırmak amacıyla triaçilgliserol, diaçilgliserol, monoaçilgliserol, yağ asitleri, yağ alkolleri, lesitin, sorbitan tristearat, fitosteroller ve γ -oryzanol gibi farklı tipte organojelatörler gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. İyi organojelatör fonksiyonu taşımaları, farklı gıda tipleri için uygunlukları, kısmen fiyatlarının uygun olması, ticari olarak ulaşılabilirliği ve düşük konsantrasyonlarda etkili bir şekilde kullanıma uygunluğu gibi pek çok özelliklerden dolayı gıda endüstrisinde en sık tercih edilen organojelatör ise mumlardır (5, 13, 15-20).

Mumların düşük polarizasyon değerine, uzun zincir yapısına ve yüksek erime noktasına sahip komponentlerden oluşma özelliği sıvı yağlara mükemmel kristalizasyon özelliği kazandırır. Bu nedenle mumlar güçlü yağ bağlama özellikleriyle birlikte üç boyutlu ağ yapısı içine kolaylıkla hapsolurlar ve dayanıklı jel yapıları oluştururlar (5). Literatürde, oleojellerin katı yağa alternatif olarak unlu mamullerde (7-9, 13) ve süt ürünlerinde (14, 21) ayrıca emülsiyon stabilitesini sağlamak ve yağı azaltmak amacıyla et ürünlerinde kullanılmasına dair çalışmalara rastlanmaktadır (2). Son yıllarda yapılan çalışmalar, kandelila (candelilla) ve karnauba (carnauba) mumlarının düşük konsantrasyonlarda güçlü jel oluşturan son derece etkili oleojeller olduklarını göstermiştir (15, 17, 22, 23). Doan ve ark. (5) çeşitli mumların pirinç kepeği yağıyla oleojel oluşturma davranışlarını reolojik ölçümler, DTK (diferansiyel taramalı kalorimetre) ve polarize ışık mikroskobu kullanarak test etmişlerdir. Yapılan çalışmada, karnauba Brezilya ve meyve mumlarının pirinç kepeği yağıyla oleojel oluşturma özelliklerinin reolojik davranış açısından zayıf olduğunu ancak %2 konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonda kullanılsa dahi karnauba yabani mumu, dut mumu, kandelila mumu, balmumu mumu ve ayçiçeği mumunun son derece etkili organojeller olduğunu ortaya koymuştur. Hwang ve ark. (17) yaptıkları çalışmada ayçiçeği, kandelila ve pirinç kepeği mumlarının soya yağı ile oleojel oluşturma özelliklerini araştırmışlar. Yapılan çalışmada, ayçiçeği mumunun diğer mum türlerine göre soya yağıyla çok daha dayanıklı jel yapısı oluşturduğunu dolayısıyla ayçiçeği mumunun çok daha etkili bir organojelatör olduğunu ortaya koymuşlardır. Blake ve Marangoni (23) farklı türde (pirinç kepeği, ayçiçek, kandelila ve karnauba) ve farklı konsantrasyondaki (%1, 2 ve 4) bitkisel mumların kanola yağıyla oleojel oluşturma özelliklerini karşılaştırmışlardır. Erime ve kristalizasyon, mikro-yapısal, reolojik ve yağ bağlama özellikleri bakımından pirinç kepeği ve ayçiçek mumlarının daha etkili organojelatörler olduğunu ortaya koymuşlardır.

Oleojellerin katı yağ ikamesi olarak kullanımına dair literatürde çalışmalar yer almakla birlikte, oleojellerin fonksiyonlarını ortaya koyan çalışmalar

oldukça kısıtlıdır. Mumlardan oluşan oleojeller yüksek kayma ve zamana bağlı karakteristik özelliklerinden dolayı son derece kompleks reolojik özellikler gösterir. Yapılarındaki fraktal agregatlar boşlukları doldurur ve bu özellik oleojellere yüksek elastik özellik ve lineer rejimde yüksek viskozite kazandırır. Kristal partiküllerden oluşan oleojellerin üç boyutlu ağ yapısı kayma gerilmesine karşı duyarlı olup, oleojellerin reolojik özellikleri deformasyona karşı son derece hassastır ve kayma sırasında daha küçük agregatlara ayrılır (8, 9, 14). Oleojellerin gıdalarda kullanım alanlarını arttırabilmek amacıyla kayma sırasındaki akış davranışlarını ve deformasyon davranışlarını anlamak böylece oleojellerin reolojik özelliklerini ortaya koymak son derece önem taşımaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada farklı mum türlerinin (ayçiçeği, pirinç kepeği ve karnauba) ayçiçek yağıyla oleojel oluşturma özelliklerini ortaya koymak amacıyla oleojellerin reolojik özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca oluşturulan oleojellerin gıdaların kalitesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla oleojellerin tekstürel özellikleri ve katı yağ içeriklerinin de belirlenmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bitkisel yağ, ayçiçek yağı (AY) ELITA (Adana, Türkiye) firmasından temin edilmiş ve -18 °C'de depolanmıştır. Deneyler için yağlar kullanılmadan bir hafta önce 4 °C tutulmuştur. Ayçiçeği mumu (AÇM), pirinç kepeği mumu (PKM) ve karnauba mumu (KM) Kalhwax GmbH & Co. KG (Trittau, Almanya) firmasından sağlamıştır.

Yöntemler

Oleojellerin Hazırlanması

Oleojeller, %5 oranında ayçiçeği mumu (AÇM), pirinç kepeği mumu (PKM) ve karnauba mumu (KM)'nin AY'na katılmasıyla ve daha sonra karışımın 150 °C'de 15 dakika boyunca manyetik balık yardımıyla karıştırılmasıyla homojen karışımlar olarak elde edilmiştir. Oleojelleri oluşturmak amacıyla, bu dispersiyonlar oda sıcaklığında bir gece bekletilmiştir.

Tekstür Profil Analizi

Oleojel örneklerinin tekstürel özellikleri bir tekstür analiz cihazı (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, UK) yardımıyla 10 mm/dak test hızı uygulanarak silindirik şekilde bir prob (çapı 5 cm) yardımıyla 25 mm çapında ve 10 mm yüksekliğinde örneklerinin yüksekliklerinin %30'una kadar sıkıştırılması sonucunda belirlenmiştir. Ölçümler sırasında 25 N'luk yük hücresi kullanılmış olup tekstürel özellikler sertlik (hardness), dış yapışkanlık (adhesiveness), iç yapışkanlık (cohesiveness), elastiklik (springness) ve sakımsızlık (gumminies) güç/zaman kurvelerinden hesaplanmıştır.

Oleojellerin Reolojik Özellikleri

Oleojel örneklerinin reolojik özelliklerini incelemek amacıyla kesme viskozitesi (shear viscosity) ve sıcaklık ve frekans tarama (temperature and frequency sweep) testleri TA reometre (AR 2000ex, Sussex, UK) ile paralel plakalı geometri (20 mm çapında ve 2 mm yüksekliğinde) kullanılarak yapılmıştır. Belirli sıcaklıklarda bir seri gerilme taraması (strain sweep) deneyleri yapıldıktan sonra, 0.001 değeri oleojellerin doğrusal viskoelastik bölgesi için en uygun gerilim gerginliği (strain amplitude) olarak belirlenmiş ve sıcaklık ve frekans tarama testlerinde kullanılmıştır.

Sıcaklık tarama testleri için, tamamen erimiş test örnekleri Peltier sıcaklık kontrol ünitesine yerleştirilmiş ve oleojellerin viskoziteleri 100/s kayma hızında ve 2 °C/dak ısıtma hızında sıcaklık 50 °C'den 90 °C'e çıkarken analiz edilmiştir. Dinamik viskoelastik özelliklerse, sıcaklık 25 °C'den 80 °C'e artarken 2°C/dak ısıtma oranında 1 Hz boyunda frekansta, oleojellerin doğrusal viskoelastik bölgesinde, dinamik sıcaklık rampa testleri yardımıyla belirlenmiştir. Frekans tarama testleri 0.1-20 Hz aralığında belirlenmiş ve depolama (G') ve kayıp (G'') modülüsleri belirlenmiştir. Yapılan her test üç paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Katı Yağ Oranının Belirlenmesi

AÇM, PKM ve KM oleojellerinin katı yağ oranı değerleri, belirli sıcaklıklarda bir Maran SFC (Resonance Instrument Ltd., Witney, UK) nükleer

manyetik rezonans enstrümanı aracılığıyla AOCS Official Cd 173, no: 16b-93 metoduna (24) göre belirlenmiştir. Deneyler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Verilerin İstatistiksel Analizi

Örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ($P \leq 0.05$) olup olmadığını bulabilmek için tek yönlü ANOVA (varyans analizi) kullanılmıştır. İstatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunduğu takdirde, Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. İstatistiksel analizler MINITAB paket programı (Versiyon 16) tarafından gerçekleştirilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Tekstür Profil Analizi

Mumların oleojellerin sertlik değerleri üzerine etkileri kristal yapıları, şekil büyüklüğü ve termal kinetik davranışlarıyla açıklanabilmektedir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi en yüksek sertlik değeri AÇM oleojel örneklerinden elde edilirken, en düşük sertlik değerleri KM oleojel örneklerinden elde edilmiştir ($P \leq 0.05$). Doan ve ark. (5), Hwang ve ark. (25) ve Dassanayake ve ark. (26) yaptıkları çalışmalarda benzer bulgular elde etmişlerdir. Dassanayake ve ark (26) yaptıkları çalışmada mumların (pirinç kepeği, kandelila ve karnauba) oleojellerin sertlik değerleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla oleojel örneklerinin penetrasyon derinliği değerlerini belirlemiş ve yüksek penetrasyon değerlerine sahip olan oleojellerin daha yumuşak jel yapısına sahip

olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan çalışmada en yüksek penetrasyon değerleri sırasıyla karnauba, kandelila ve pirinç kepeği oleojellerinden elde edilmiştir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi en yüksek iç ve dış yapışkanlık değerleri KM oleojel örneklerinden elde edilirken en düşük iç ve dış yapışkanlık değerleri AÇM oleojel örneklerinde gözlenmiştir ($P \leq 0.05$). AÇM oleojelleri daha yüksek sertlik değerlerine sahip oldukları için, diğer oleojel örneklerine göre daha yüksek sakızimsılık (sertlik x iç yapışkanlık) değerlerine sahip olmuşlardır. Diğer bir ifadeyle, ayçiçek yağı, ayçiçeği mumundan oluşan jel paketi içerisine çok daha iyi bir şekilde hapis olarak, sertlik değerleri daha yüksek güçlü oleojel paketleri oluşturmuşlardır. Hwang ve ark (25) yaptıkları çalışmada benzer bulgulara ulaşmışlardır. Yapılan çalışmada, KM oleojellerinin AÇM oleojelleri gibi güçlü jel yapıları oluşturmamalarını karnauba mumunun yapısındaki alifatik esterlerin ve p-hidroksisinamik alifatik diesterlerin karışımının ayçiçeği mumunun yapısındaki mum esterler kadar güçlü jel oluşturma özelliği olmamasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada, pirinç kepeği mumunun yapısında yer alan mum esterlerin pirinç kepeği mumu oleojellerinin güçlü jel paketi oluşturmaya neden olduğu belirtilmiştir.

Oleojellerin Reolojik Özellikleri

Çizelge 2'de görüldüğü gibi farklı tür mumlarla hazırlanan oleojel örneklerinin viskoziteleri sıcaklığın bir fonksiyonu olarak gözlenmiş ve viskozitelerinin sıcaklığa göre değişimi Arrhenius modeline göre ifade edilmiştir (7);

Çizelge 1. Farklı türdeki mumlarla hazırlanan oleojel örneklerinin tekstürel özellikleri
Table 1. Textural properties of oleogel samples prepared with different types of waxes

Tekstürel özellikler Textural properties	AÇM oleojel SFW oleogel	PKM oleojel RBW oleogel	KM oleojel CW oleogel
Sertlik (N) Hardness (N)	5.41 ^a	3.84 ^b	2.78 ^c
Dış yapışkanlık (N.s) Adhesiveness	4.23 ^a	2.95 ^b	2.01 ^c
İç yapışkanlık Cohesiveness	0.33 ^b	0.38 ^a	0.41 ^a
Sakızimsılık (N) Gumminies	1.73 ^a	1.42 ^{ab}	1.10 ^b
Elastiklik Springness	0.43 ^b	0.57 ^{ab}	0.62 ^a

Farklı harfler (a, b ve c) örnekler arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık olduğunu göstermektedir ($P \leq 0.05$). AÇM oleojel: Ayçiçek mumu oleojeli, PKM oleojel: Pirinç kepeği mumu oleojeli, KM oleojel: Karnauba mumu oleojeli. Different letters (a, b and c) show that there are statistically significant differences between samples ($P \leq 0.05$). SFW oleogel: Sunflower wax oleogel, RBW oleogel: Rice bran wax oleogel, CW oleogel: Carnauba wax oleogel.

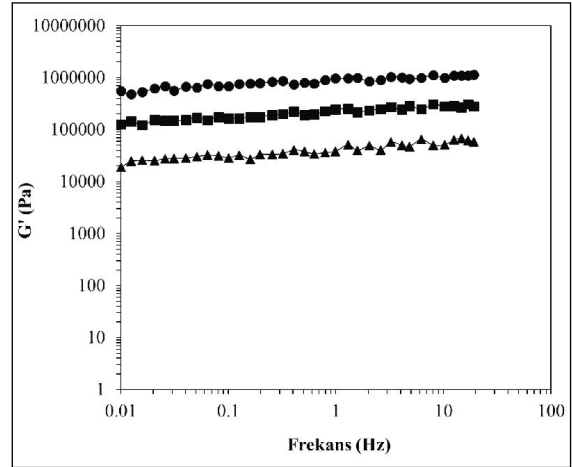
$$\eta = A \cdot \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (1)$$

Denklemden η yağ viskozitesi, A preeksponansiyel faktör, E_a aktivasyon enerjisi, R gaz sabiti ve T mutlak sıcaklık anlamına gelmektedir.

Vizkozite-sıcaklık ilişkisi, Arrhenius modeli temel alınarak türetilen bir eksponansiyel denklem ile ortaya koyulmuş ve determinasyon katsayısı ($R^2 > 0.83$) elde edilmiştir. Elde edilen bu yüksek determinasyon katsayısı da modellenin uygunluğunu göstermiştir. Arrhenius denkleminde yer alan aktivasyon enerjisi (E_a), $\ln(\eta)$ (\ln .viskozite)'nin sıcaklığın tersi ($1/T$) ile olan grafiğin eğimiyle orantılıdır. Yüksek E_a , elde edilen eğrinin eğiminin daha dik olduğunu gösterir ve oleojellerin sıcaklığa karşı reolojik olarak hassasiyetini gösteren bir yaklaşımdır. Çizelge 2'de gösterildiği gibi en düşük E_a değeri AÇM oleojellerinden elde edilmiş ($P \leq 0.05$), dolayısıyla AÇM oleojellerinin viskoziteleri artan sıcaklıkla sadece küçük bir değişim sergilemiştir. Öte yandan, en yüksek E_a değeri KM oleojel örneklerinden elde edilmiştir ($P \leq 0.05$) ve bu yüksek E_a değeri KM oleojel örneklerinin yapısal olarak sıcaklığa karşı hassasiyetlerini ortaya koymuştur.

Şekil 1 a ve b'de mumların oleojellerin viskoelastik özellikleri üzerine etkisi görülmektedir. Bütün oleojel örneklerinin depolama modülüs (G') değerlerinin kayıp modülüs (G'') değerlerinden daha yüksek olması, oleojel örneklerinin baskın elastik, jel karakteristik özelliklerini ortaya koymuştur. Şekil 1a ve b'de görüleceği gibi en yüksek depolama modülüs ve kayıp modülüs değerleri AÇM oleojel örneklerinden elde edilirken, KM oleojellerinin düşük depolama ve kayıp modülüs değerlerine sahip olmaları viskoelastik

yapılarının zayıf olduğunu göstermiştir. Mert ve Demirkesen (9) yaptıkları çalışmada, sadece kanola yağı içeren hamurlara kıyasla oleojel ile hazırlanan hamurların çok daha yüksek depolama ve kayıp modülüs değerlerine sahip olduklarını belirtmiştir. Yine aynı çalışmada, tekstürel açıdan bakıldığında oleojel örnekleriyle hazırlanan hamurları sıkıştırmak için gereken kuvvetin yani sertlik değerinin çok daha fazla olduğu bulunmuştur. Çizelge 1 ve Şekil 1a ve b'de görüldüğü gibi AÇM içeren oleojel örnekleri daha yüksek sertlik değerlerine ve aynı zamanda daha yüksek depolama ve kayıp modülüs değerlerine sahip olurken, KM içeren oleojel örneklerinden daha düşük sertlik değeri ve daha zayıf viskoelastik özellikler elde edilmiştir.



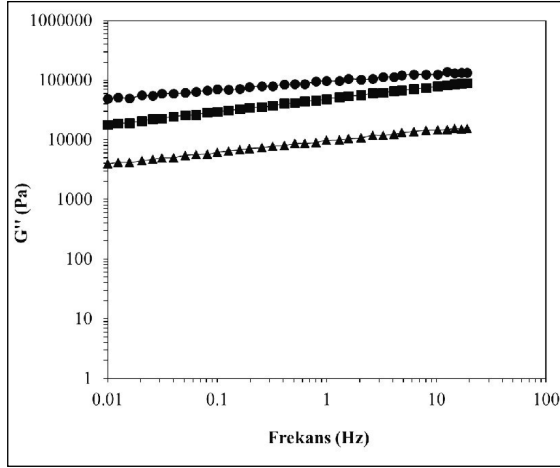
Şekil 1a. Farklı türdeki mumlarla hazırlanan oleojel örneklerinin frekans tarama depolama (G') modülüs değerleri. (●): Ayçiçeği mumu oleojeli, (■): Pirinç Kepeği mumu oleojeli, (▲): Karnaubu mumu oleojeli.

Figure 1a. Frequency sweep storage (G') modulus values of oleogel samples prepared with different types of waxes. (●): Sunflower wax oleogel, (■): Rice Bran wax oleogel, (▲): Carnauba wax oleogel.

Çizelge 2. Farklı türdeki mumlarla hazırlanan oleojel örneklerinin Arrhenius model parametreleri
Table 2. Arrhenius model parameters of oleogel samples prepared with different types of waxes

	E_a (J/kg.mol)	A (Pa.s)	R^2
AÇM oleojel	$2.87E+07 \pm 6.06E+05^c$	$1.53E-05 \pm 3.18E-06^a$	0.8786
SFW oleojel			
PKM oleojel	$3.38E+07 \pm 5.78E+05^b$	$1.97E-06 \pm 2.56E-14^b$	0.8367
RBW oleojel			
KM oleojel	$4.39E+07 \pm 8.24E+05^a$	$2.08E-08 \pm 4.98E-12^c$	0.8959
CW oleojel			

Farklı harfler (a, b ve c) örnekler arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık olduğunu göstermektedir ($P \leq 0.05$). AÇM oleojel: Ayçiçek mumu oleojeli, PKM oleojel: Pirinç kepeği mumu oleojeli, KM oleojel: Karnaubu mumu oleojeli. Different letters (a, b, and c) show that there are statistically significant differences between samples ($P \leq 0.05$). SFW oleojel: Sunflower wax oleogel, RBW oleojel: Rice bran wax oleogel, CW oleojel: Carnauba wax oleogel.



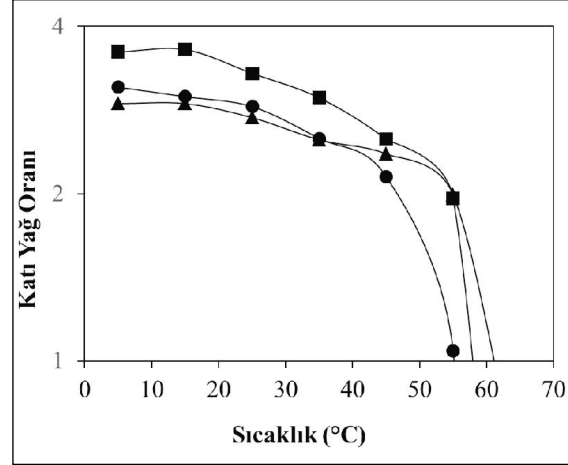
Şekil 1b. Farklı türdeki mumlarla hazırlanan oleojel örneklerinin frekans tarama kayıp (G'') modülüs değerleri. (●): Ayçiçeği mumu oleojeli, (■): Pirinç Kepeği mumu oleojeli, (▲): Karnaubu mumu oleojeli.

Figure 1a and b. Frequency sweep loss (G'') modulus values of oleogel samples prepared with different types of waxes. (●): Sunflower wax oleogel, (■): Rice Bran wax oleogel, (▲): Carnauba wax oleogel.

Katı Yağ Oranının Belirlenmesi

Şekil 2 farklı türdeki mumların (AÇM, PKM ve KM) oleojellerin katı yağ oranlarına etkisini sıcaklığın fonksiyonu olarak göstermektedir. Oleojellerin katı yağ oranı profillerindeki farklılık mumların oleojellerin katı yağ oranı üzerine güçlü etkilerini sergilemektedir. Katı/sıvı yağ oranı gıdalardan istenilen kalite özelliklerini elde etmek için oldukça önemli bir rol oynayan bir parametredir. Örneğin, unlu mamullerin üretiminde kullanılan yağın yeterli katı yağ oranı içermesi hamurun karıştırılması sırasında gaz tutma kabiliyetini artırarak, elde edilen ürünün yumuşak bir tekstüre ve homojen şekilde dağılmış gözeneklere sahip olmasını sağlamaktadır (8). Mert ve Demirkese (8, 9) yaptıkları çalışmada, sorteninge kıyasla oleojel örneklerinin, özellikle %3 oranında mum içeren oleojel örneklerinin çok düşük katı yağ oranına sahip olduğunu ancak yüksek oranda (%6) mum kullanılmasıyla oleojel örneklerinin katı yağ oranlarının arttığını gözlemlemişlerdir. Şekil 2'de görüldüğü gibi, 60-65, 55-60, 50-55°C sıcaklıklar arasında sırasıyla KM, PKM ve AÇM'lerinin katı yağ oranlarında keskin düşüşler meydana gelmiştir. Bütün oleojel örnekleri içerisinde KM oleojelinin katı yağ oranı vücut sıcaklığına (body temperature) yakın bir sıcaklıkta sabit kalmıştır. Tüm mumlar için kristal

fazın tamamen erimesi için yüksek sıcaklıklara (50-70 °C) ihtiyaç duyulmuştur. Ancak kristal fazın tamamen erimesi için gerekli olan sıcaklık değerinin diğer oleojel örneklerine göre KM oleojelleri için daha yüksek olduğu görülmüştür (70 °C).



Şekil 2. Farklı türdeki mumlarla hazırlanan oleojel örneklerinin katı yağ oranı. (●): Ayçiçeği mumu oleojeli, (■): Pirinç Kepeği mumu oleojeli, (▲): Karnaubu mumu oleojeli.

Figure 2. Solid fat content of oleogel samples prepared with different types of waxes. (●): Sunflower wax oleogel, (■): Rice Bran wax oleogel, (▲): Carnauba wax oleogel.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı türde mumların (ayçiçek, pirinç kepeği ve karnaubu) ayçiçek yağıyla kombinasyonlarından farklı tipte oleojeller oluşturulmuş ve oleojellerin yağ-jelleşme özellikleri reolojik, tekstürel ve katı yağ tayini ölçümleri yardımıyla belirlenmiştir. Ayçiçek mumunun kullanıldığı oleojel örnekleri daha sert tekstüre sahip olurken, en yumuşak tekstür ise karnaubu mumu içeren oleojel örneklerinden elde edilmiştir. Karnaubu mumu içeren oleojel örnekleri sıcaklığa karşı oldukça fazla duyarlılık gösterirken, ayçiçek mumu içeren oleojel örnekleri sıcaklığa karşı düşük hassasiyet sergilemişlerdir. Oleojel örneklerinin viskoelastik özellikleri incelendiğinde, en yüksek depolama ve kayıp modülüs değerleri ayçiçeği mumu içeren oleojel örneklerinden elde edilmiştir. Ayrıca, karnaubu mumu içeren oleojel örneklerinin viskoelastik özellikleri tekstürel özellikleriyle paralellik göstermiş ve bu örneklerden düşük depolama ve kayıp modülüs değerleri elde edilmiştir. Mevcut tüketici talepleri kaliteden ödün vermeden düşük oranda katı yağ içeren

ürünlerin üretilmesi yönündedir ve bu beklentiyi karşılamak amacıyla düşük oranda katı yağ içeren işlenmiş gıdaların üretimi için oleojellerin kullanımının artırılması gıda sanayine fayda sağlayacaktır. Yapılan çalışma sonucunda özellikle ayçiçek yağı mumunun ayçiçek yağı ile oluşturduğu oleojellerin gıdalarda başarı ile kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Öğütücü M, Yılmaz E. 2012. Margarinlere Alternatif Olabilecek Yeni Bir Ürün: Oleojeller-I. *Dünya Gıda*, 01, 68-73.
- Stortz TA, Zetzl AK, Barbut S, Cattaruzza A, Marangoni AG. 2012. Edible oleogels in food products to help maximize health benefits and improve nutritional profiles. *Lipid Technol*, 24 (7), 151-154.
- Patel AR, Rajarethinam PS, Gredowska A, Turhan O, Lesaffer A, De Vos WH, De walle DV, Dewettinck K. 2014. Edible applications of shellac oleogels: spreads, chocolate paste and cakes. *Food Funct*, 5(4), 645-652.
- Zetzl AK, Marangoni AG, Barbut S. 2012. Mechanical properties of ethylcellulose oleogels and their potential for saturated fat reduction in frankfurters. *Food Funct*, 3(3), 327-337.
- Doan CD, Van de Walle D, Dewettinck K, Patel AR. 2015. Evaluating the oil-gelling properties of natural waxes in rice bran oil: Rheological, thermal, and microstructural study. *J Am Oil Chem Soc*, 92(6), 801-811.
- Zetzl AK, Gravelle AJ, Kurylowicz M, Dutcher J, Barbut S, Marangoni AG. 2014. Microstructure of ethylcellulose oleogels and its relationship to mechanical properties. *Food Struct*, 2 (1), 27-40.
- Jang A, Bae W, Hwang HS, Lee HG, Lee S. 2015. Evaluation of canola oil oleogels with candelilla wax as an alternative to shortening in baked goods. *Food Chem*, 187, 525-529.
- Mert B, Demirkesen I. 2016. Reducing saturated fat with oleogel/shortening blends in a baked product. *Food Chem*, 199, 809-816.
- Mert B, Demirkesen I. 2016. Evaluation of highly unsaturated oleogels as shortening replacer in a short dough product. *LWT-Food Sci Technol*, 68, 477-484.
- Öğütücü M, Arifoğlu N, Yılmaz E. 2015. Preparation and Characterization of Virgin Olive Oil-Beeswax Oleogel Emulsion Products. *J Am Oil Chem Soc*, 92(4), 459-471.
- Patel AR, Dewettinck K. 2015. Comparative evaluation of structured oil systems: Shellac oleogel, HPMC oleogel, and HIPE gel. *Euro J Lipid Sci Technol*, 117(11), 1772-1781.
- Patel AR, Cludts N, Sintang MDB, Lesaffer A, Dewettinck K. 2014. Edible oleogels based on water soluble food polymers: preparation, characterization and potential application. *Food Funct*, 5(11), 2833-2841.
- Yılmaz E, Öğütücü M. 2015. The texture, sensory properties and stability of cookies prepared with wax oleogels. *Food Funct*, 6(4), 1194-1204.
- Zulim Botega DC, Marangoni AG, Smith AK, Goff HD. 2013. The potential application of rice bran wax oleogel to replace solid fat and enhance unsaturated fat content in ice cream. *J Food Sci*, 78(9), 1334-1339.
- Blake AI, Marangoni AG. 2015. Plant wax crystals display platelet-like morphology, *Food Struct*, 3, 30-34.
- Dassanayake LSK, Kodali DR, Ueno S, Sato K. 2009. Physical properties of rice bran wax in bulk and organogels. *J Am Oil Chem Soc*, 86 (12), 1163-1173.
- Hwang HS, Kim S, Evans KO, Koga C, Lee Y. 2015. Morphology and networks of sunflower wax crystals in soybean oil organogel. *Food Struct*, 5, 10-20.
- Rogers MA, Strober T, Bot A, Toro-Vazquez JF, Stortz T, Marangoni AG. 2014. Edible oleogels in molecular gastronomy. *Int J Gastro Food Sci*, 2 (1), 22-31.
- Toro-Vazquez JF, Mauricio-Pérez R, González-Chávez MM, Sánchez-Becerril M, de Jesús Ornelas-Paz J, Pérez-Martínez JD. 2013. Physical properties of organogels and water in oil emulsions structured by mixtures of candelilla wax and monoglycerides. *Food Res Int*, 54 (2), 1360-1368.
- Toro-Vazquez JF, Morales-Rueda JA, Dibildox-Alvarado E, Char-Alonso MA, Alonzo-Macías M, González-Chávez MM. 2007. Thermal and textural properties of oleogels developed by candelilla wax in safflower oil. *J Am Oil Chem Soc*, 84, 989-1000.

21. Bemer HL, Limbaugh M, Cramer ED, Harper WJ, Maleky F. 2016. Vegetable organogels incorporation in cream cheese products. *Food Res Int*, 85, 67-75.
22. Blake AI, Marangoni AG. 2014. Structure and physical properties of plant wax crystal networks and their relationship to oil binding capacity. *J Am Oil Chem Soc*, 91 (6), 885-903.
23. Blake AI, Marangoni AG. 2015. The use of cooling rate to engineer the microstructure and oil binding capacity of wax crystal networks. *Food Biophys*, 10 (4), 456-465
24. AOCS. 1989. Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society, Method Cd 16b-93. Champaign, IL, USA.
25. Hwang HS, Kim S, Singh M, Winkler-Moser JK, Liu SX. 2012. Organogel formation of soybean oil with waxes. *J Am Oil Chem Soc*, 89 (4), 639-647.
26. Dassanayake LSK, Kodali DR, Ueno S, Sato K. 2009. Physical properties of rice bran wax in bulk and organogels. *J Am Oil Chem Soc*, 86 (12), 1163-1173.

BAKTERİYOFAJ ENKAPSÜLASYONU VE POTANSİYEL UYGULAMALARI

Derya Saygılı*, Cem Karagözlü

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 10.05.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 13.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2016

Özet

Enkapsülasyon, aktif olan maddenin çevresinde uygun kaplama materyali ile koruyucu bir zar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon istenen bileşenin dış etkenlere karşı korunması, bazı özelliklerinin sürdürülebilmesi, kolay taşınması, tat ve koku maskeleyme, oluşabilecek reaksiyonların önüne geçme gibi amaçlarla kullanılmasına rağmen koruyucu ve tedavi amaçlı fajların enkapsülasyonunun da oldukça etkili bir yöntem olarak uygulanabildiği bilinmektedir. Bakteriyofajlar 20. yüzyılın başlarından beri bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma ve tedavi amacıyla kullanılmış ancak artan antibiyotik tüketimi, fajların tedavi amaçlı kullanımının önüne geçmiştir. En önemli özelliği yüksek spesifitesi olan bakteriyofajlar, çiftlik hayvanlarında patojen kolonizasyonunun azaltılması (faj tedavisi), çiğ süt, et ve taze gıdalarda dekontaminasyon (biyokontrol), ekipman yüzeylerinde sanitasyon (biyosanitasyon), hazır gıdalarda raf ömrü uzatmak (biyoprezervasyon) amacıyla uygulanabilen etkin bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyofaj enkapsülasyon uygulamalarında, fonksiyonel kaplama uygulamalarındaki gelişmelere paralel olarak daha uygun maliyetli ve daha uzun süre muhafaza edilebilen mikrokapsül teknolojilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Enkapsülasyon, bakteriyofaj, faj tedavisi, biyokontrol, biyosanitasyon, biyoprezervasyon

BACTERIOPHAGE ENCAPSULATION AND POTENTIAL APPLICATIONS

Abstract

Encapsulation is based on forming a protective membrane around the active substance with a suitable coating material. Although microencapsulation is applied for purposes including protection of some components against external factors, preservation of some features, easy handling, flavor and odor masking, prevention of some reactions, it is known that the phage encapsulation can be highly effective for protection and treatment purposes. Since the early 20th century, bacteriophages are used for the prevention and treatment of bacterial infections, however the increase in the consumption of antibiotics has prevented the use of phages for treatment. One of the most important properties of bacteriophages is the high specificity. They are effectively used for the reduction of pathogen colonization in farm animals (phage therapy), decontamination of raw milk, meat and fresh food (biocontrol), sanitation of equipment surfaces (biosanitation), extending the shelf life of prepared foods (biopreservation). There is a need for the development of microcapsule technology which is relatively cost effective and allows longer storage periods in parallel with the developments in functional coating applications.

Keywords: Encapsulation, bacteriophage, phage therapy, biocontrol, biosanitation, biopreservation

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ derya.saygili@ege.edu.tr,

☎ (+90) 543 822 2709,

☎ (+90) 232 311 4471

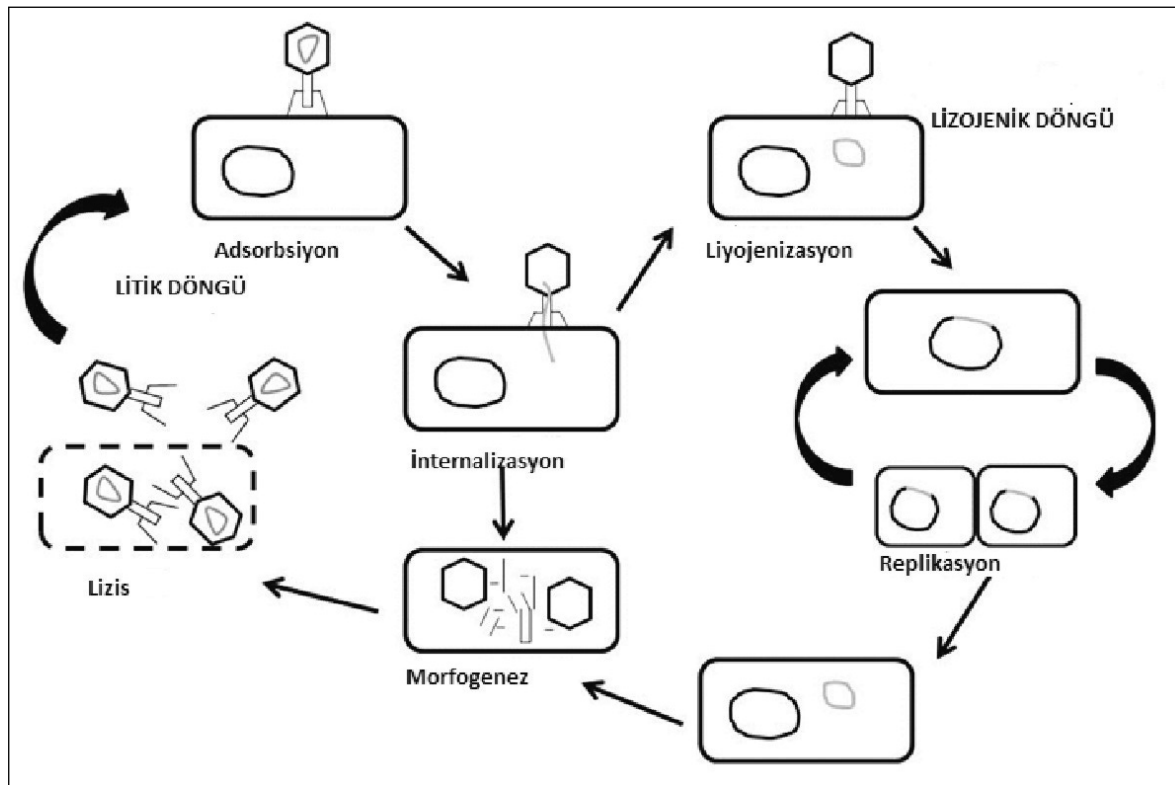
BAKTERİYOFAJLAR

Bakteri virüsleri olarak tanınan bakteriyofajlar, dünya üzerinde en çok var olan canlılar olup bakterilerin zorunlu parazitleri olarak yalnızca canlı bakteri hücreleri içerisinde çoğalmaktadırlar (1, 2). Bakteriyofajlar ilk olarak, 1896 yılında İngiliz bilim adamı Ernest Hanbury Hankin tarafından fark edilmiş, *Vibrio cholerae* bakterisinin Ganj Nehri suyunda öldüğünü ve su kaynatıldığında bu özelliğini kaybettiğini fark eden Hankin, bu olaya canlı bir varlığın sebep olduğunu ileri sürmüştür. Bu hipotezden yaklaşık 20 yıl sonra, ilk olarak bakteriyofaj tanımı Paris'te Pasteur Enstitüsünde çalışan bir mikrobiyolog olan Felix D'Herelle tarafından yapılmıştır (2). Bakteriler dışındaki canlılara (insan, hayvan, bitki) karşı zararsız olan bakteriyofajlar, pek çok farklı özelliğe göre sınıflandırılabilirler da genel anlamda en çok kullanılan sınıflandırma yöntemi kuyruk morfolojilerine göre yapılmaktadır. Bakteriyofajlar *Myoviridae* (kasılabilen kuyruk), *Siphoviridae* (uzun kısılmayan kuyruk) ve *Podoviridae* (çok kısa kuyruk) olarak 3 gruba ayrılmaktadır (3).

İki farklı yaşam döngüsüne sahip olan bakteriyofajlar Şekil 1.'de görüldüğü gibi litik ya da lizojenik

fazda çoğalmaktadırlar. Litik döngüde çoğalan virüs hücresi konak hücrenin ölmesine sebep olurken, lizojenik döngüde ise faj enfekte olmaktan ancak besin maddelerinin yetersiz kalması durumunda endojen fajlar etkinleşerek konak hücre parçalanmaktadır. Fajların ilk keşfi ile tedavi amaçlı kullanımına yönelik uygulamalarda, fajın litik ve lizojenik formda oluşu büyük önem taşımıştır. Litik fajlar tedavilere olumlu sonuçlar verirken, lizojenik fajlarda tedavi edici etki görülmemiş ve bu durum fajlar hakkında fikir ayrılıklarının yaşanmasına yol açmıştır (2, 4, 5).

20. yüzyılın başlarında fajların keşfedilmesiyle birlikte bakteri enfeksiyonlarına karşı koruyucu ve tedavi edici amaçlı kullanımları da gündeme gelmiştir. Faj tedavisi, fajların ilk keşfedildiği yıllarda tifo, kolera, idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmış ancak kalite kontrollerinin sağlıklı yapılamaması, yeterince saflaştırılmaması gibi çeşitli sebeplerle yapılan tedavilerin bir kısmında olumlu sonuç alınmadığı görülmüştür. 1928 yılında ise, Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesiyle antibiyotik çağı başlamış ve fajlara olan ilgi bir anda önemini yitirmiştir (2, 6).



Şekil 1. Bakteriyofajların litik ve lizojenik yaşam döngüsü

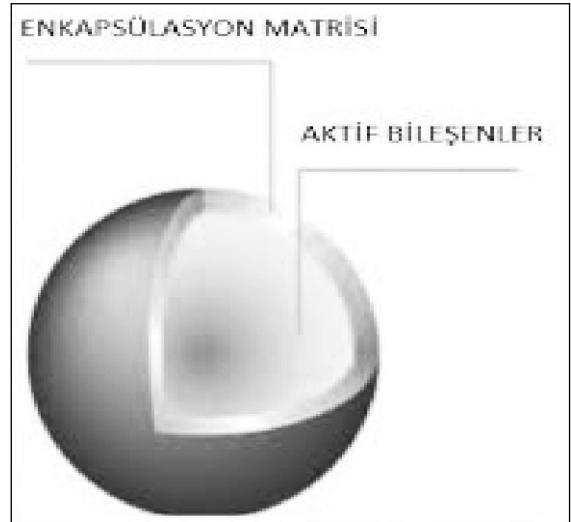
Günümüze bakıldığında, uygunsuz antibiyotik kullanımının toplumda dirençli bakterilerin hızla yaygınlaşmasına sebep olduğu görülmektedir (7). Hak ettiği önemi keşfedildiği dönemde göremeyen fajlara yönelik çalışmalar ise, günümüz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte tekrar güncel hale gelmeye başlamıştır. Gıda sanayinde çiftlik hayvanlarında patojen kolonizasyonunu önlemek (faj tedavisi), çiğ et süt ve benzeri ürünlerde dekontaminasyonu önlemek (biyokontrol), gıda ile temas eden yüzey ve ekipmanların sanitasyonu (biyosanitasyon) ve hazır gıdalarda raf ömrünü uzatabilmek (biyoprezervasyon) gibi amaçlarla fajlardan yararlanmak mümkün olabilmektedir (8, 9). Antibiyotiklerin aksine yüksek spesifiteye sahip fajlar, düşük dozlarda dahi etkili olabilmektedir. Diğer antimikrobiyel yöntemlerle karşılaştırıldığında doğada yaygın olarak bulunmaları sayesinde nispeten daha ucuz bir yöntem olması ve gıda içeren kaynaklardan kolay izole edilebilir olmaları da fajları ön plana çıkaran özellikleri oluşturmaktadır (8, 10).

Bakteriyofajların antimikrobiyel ajan olarak kullanılabilmesinin tekrar gündeme gelmesi ile dünya genelinde pek çok firma tarafından faj bazlı antimikrobiyel ajanlar üretilmeye başlanmıştır. Patojen bakteriler gıdaya hayvanın kesimi, sağımı, depolama, ambalajlama veya uygulanan teknolojik işlemler esnasında da kontamine olabilmektedir. Özellikle çiftlik hayvanlarında görülen ve insan sağlığını riske atan *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella*, *Listeria* ve *Campylobacter* gibi en önemli patojenlere karşı geliştirilen ve gıda katkı maddesi adıyla ticari olarak üretilen fajların tüketime hazır gıdalar, hayvan besleme ve tedavide kullanımı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi ve Tarım Bakanlığı tarafından da onaylanmıştır (11, 12). Söz konusu amaçlarla ihtiyaç duyulan faj uygulamalarında, fajların oral yolla alımı (gıda veya su içerisine ilave edilerek) veya aerosol sprey uygulaması söz konusudur (13). Her iki uygulama şekli için de bakteriyofajların canlılıkları tartışılır bir konu haline geldiğinden zaman içerisinde faj uygulamaları için yeni teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden en çok tercih edileni ise enkapsülasyon uygulamalarıdır.

ENKAPSÜLASYON UYGULAMALARI

Bir maddenin veya karışımın genellikle protein ya da karbonhidrat bazlı başka bir madde veya

sistem ile hapsedilmesi olarak tanımlanan tekniğe 'Enkapsülasyon' adı verilmektedir. Enkapsülasyon teknolojisi günümüzde farmakoloji, kimya, kozmetik, tıp, biyoteknoloji ve gıda gibi bir çok farklı alanda kullanılan ve uygulandığı ürünün fonksiyonel özelliklerini geliştirmede geniş imkanlar sunan bir teknolojidir (14-17). Enkapsülasyon uygulamaları elde edilen kapsüllerin mikro çaplarına bağlı olarak isimlendirilmekte ve gıda sanayinde daha çok 1 µm'den büyük çapa sahip mikrokapsüller tercih edildiğinden yöntem 'mikroenkapsülasyon' olarak adlandırılmaktadır (18). Şekil 2.'de görüldüğü gibi mikrokapsüller küre şeklinde olup etrafında homojen bir duvar yer almaktadır. Mikrokapsül içerisindeki kaplanan materyal öz (çekirdek) olarak ifade edilirken dış kaplama materyali membran (kabuk) olarak tanımlanmaktadır (19).



Şekil 2. Mikroenkapsül yapısı

Mikroenkapsülasyon teknolojisinin gıda sanayinde kullanımı oldukça eskiye dayanmakla birlikte son dönemlerde daha güncel hale gelmiştir. Mikroenkapsülasyon uygulamalarında kaplama materyalinin kompozisyonu elde edilecek olan son ürünün fonksiyonel özelliklerini doğrudan etkilediğinden ideal bir kaplama materyali dizaynı oldukça önemlidir (20, 21). Tercih edilen kaplama materyali çekirdeği hem işlem hem de depolama aşamalarında stabil bir şekilde koruyabilmeli, çekirdek materyal ile reaksiyona girmemelidir. Kapsülleme işleminde kolay işlenebilmeli, emülsiyon stabilitesi yüksek olmalı, istenen çözgüde çözünebilir özelliklere sahip ve maliyeti düşük olmalıdır (22).

BAKTERİYOFAJ ENKAPSÜLASYONU POTANSİYEL UYGULAMALARI

Her alanda farklı uygulama imkânları sunan mikroenkapsülasyon yöntemi gıda sanayisinde ilk olarak probiyotik mikroorganizmaların gıdalarla daha etkin tüketimini sağlamak amacıyla tanışmıştır.

Olumsuz çevre koşullarından çok hızlı etkilenen probiyotik canlıların insan gastrointestinal sisteminde yararlılığını arttırmak amacıyla mikroenkapsülasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda uygulanan mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda probiyotiklerin daha uzun süre canlılığını koruduğu ve biyoyararlılığının artırıldığı ifade edilmiştir (23-26).

Gıda sanayinde en çok tercih edilen mikroenkapsülasyon yöntemi sprey kurutma yöntemidir. Ürünlerin içerisindeki suyun uzaklaştırılması, depolama ve taşıma maliyetlerinin azaltılması ve ürünlerin spesifik özelliklerinin korunması amacıyla gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan bu yöntem, süttozu üretimi ile birlikte geliştirilmiştir. Sprey kurutma yöntemi en yaygın ve en ucuz teknik olmasına rağmen bu yöntemde kapsülleme amacıyla tercih edilecek olan materyal seçimi oldukça önemlidir (27-29). Uygulamada atomizer içerisinde hem çekirdek adı verilen kaplanacak materyal hem de kaplama materyali bir arada bulunmaktadır. Bu yöntemde en büyük dezavantaj yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulması iken son üründe istenen miktarda hücre canlılığını korumanın da zor olduğu bildirilmiştir (30). Yüksek sıcaklıklarda çalışmanın enkapsülasyon uygulamalarında belli sorunlara sebep olduğunun rapor edilmesi üzerine (31, 32), bazı araştırmacılar tarafından daha düşük sıcaklıklarda enkapsülasyon yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalara odaklanılmıştır (33). Bakteriyo-fajların enkapsüle edilmesine yönelik birçok araştırmacı tarafından farklı çalışma koşullarında uygulamalar yapılmıştır. Genellikle *Staphylococcus aureus*'un sebep olduğu bilinen bakteriyel akciğer enfeksiyonunun tedavisi amacıyla sprey kurutma yöntemi ile laktoz, trehaloz ve dekstran varlığında mikroenkapsüle edilmiş faj üretimi için optimum endüstriyel üretim şartlarının arandığı bir çalışma yapılmıştır. Araştırmada, *Myovirus romulus* ve *Podovirus LUZ 19* sayılarında mikroenkapsülasyon işlemi esnasında meydana gelen azalma sırası ile 2.58 ve 0.02 logaritmik birim olarak bildirilmiştir. Çalışma sonucunda *Myovirus romulus* sayısında

hassas yapısından dolayı daha yüksek kayıp meydana geldiği rapor edilmiştir (34). Yapılan araştırmanın devamı niteliğinde olan çalışmada ise, uzun süreli depolamanın fajlar üzerine etkisi incelenmiştir. *P. aeruginosa* LUZ19 ve *S. aureus Romulus* fajının depolamada gösterdiği değişimin incelendiği çalışmada, farklı sıcaklık ve bağıl nem şartlarında depolanan trehaloz ve peynir altı suyu tozlarından elde edilen mikroenkapsüle fajların stabilitesi kontrol edilmiştir. Trehaloz tozundan elde edilen mikroenkapsül uygulamasında optimum depolama şartlarının 4°C'de % 0 bağıl nem şartlarında elde edilirken, 25°C ve üzeri sıcaklıklarda depolama koşullarının stabiliteyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Peynir altı suyu tozu ile uygulanan mikroenkapsülasyon işleminde ise, 4°C'de karanlık ortamda depolanan fajların aktivasyonunda 1 aylık depolama süresince azalma olmadığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, söz konusu araştırmada ve benzer çalışmalarda tedavi amacıyla uygulanacak olan fajların depolama koşullarının dikkate alınması gereken önemli parametreler olduğu bildirilmiştir (35-37). Ağız yoluyla uygulanan faj tedavilerinde asidik çevre koşullarında ve bazı enzimlerin varlığında fajların aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar tarafından fajların asidik koşullardan ve enzimlerden korunmasını sağlamak amacıyla çeşitli kaplama materyalleri geliştirilmektedir. Aljinat ve pektin bazlı polimerlerin faj uygulamalarında etkin bir koruyucu kılıf olarak fajları olumsuz çevre koşullarından koruduğu bildirilirken, mikroenkapsül uygulamalarında peynir altı suyu proteini kullanımının fajların canlılığını koruduğu ve kontrollü salınımına imkân tanıdığı bildirilmiştir (38, 39).

Sprey kurutma yönteminin yanı sıra mikroenkapsülasyon amacıyla farklı teknikler geliştirilmiş ve bu konuda yeni teknikler geliştirilmeye devam edilmektedir. Mikroenkapsülasyon teknikleri farklı sınıflandırmalara ayrılmasına rağmen en yaygın kullanılan sınıflandırma şekli çoğu araştırmacı tarafından da kabul edilmiş olan 3 ayrı grupta toplanan kimyasal, fizikokimyasal ve fizikomekanik yöntemler sınıflandırmasıdır (40). Geliştirilen teknikler üzerine yapılan çalışmalarda her tekniğin farklı avantaj ve dezavantajlara sahip olduğu bildirilmiştir. Çizelge 1.'de sprey kurutma, ekstrüzyon ve emülsiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir (41).

Çizelge 1. Enkapsülasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Özellik	Sprey kurutma	Ekstrüzyon	Emülsiyon
Büyütülmesi	Kolay	Daha zor	Kolay
Kapsülasyon işlemi	Basit	Basit	Daha zor
Kaplama materyalinin çeşidi	Çok	Az	Çok
Şekil ve genişlik	Üniform/ Küçük	Üniform/ Büyük	Üniform değil/ Küçük
Mikroorganizma canlılığı koruma	Taşıyıcı ve sıcaklığa bağlı	Yüksek	Yüksek

Günümüz gelişmiş teknolojiyle birlikte yeniden fajların tedavi, biyokontrol, biyosanitasyon ve biyoprezervasyon amaçlarıyla etkin bir şekilde kullanımının mümkün olduğu bildirilmektedir. Güncel çalışmalar, fajların hayvan orjinli patojenlere karşı kullanılması üzerine odaklanmıştır. Uygulamada ağız yoluyla alımı (gıda veya su içerisine ilave edilerek) veya aerosol sprey olarak kullanımı söz konusu olan fajların birçok çalışmada olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir (42-44). Broiler cinsi tavukları ölümcül solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan *E.coli* den korumak amacıyla farklı yöntemlerde faj uygulamalarının etkinliğinin denendiği bir çalışmada, aerosol sprey ve kas içerisine enjeksiyon uygulamalarının ağız yoluyla alımlara oranla daha etkin sonuç verdiği bildirilmiştir (10). Koyunlarda *E.coli* O157:H7 seviyesini takip etmek amacıyla ağız yoluyla CEV1 ve CEV2 fajları üzerine çalışılmıştır. Çalışmada hem ayrı ayrı hem de karışım olarak fajların etkileri araştırılmıştır. CEV1 ve CEV2 fajlarından oluşan karışımın % 99.9 oranında patojen *E.coli* O157:H7'yi yok ettiği ve karışım halindeki faj uygulamasının ayrı halde uygulanan fajlara oranla daha etkili olduğu bildirilmiştir (45). Bir başka çalışmada, tavuklarda *Salmonella* bakterisinin kümes içerisinde bulaşmasını önlemek amacıyla yemlerle birlikte faj uygulamasının etkisi incelenmiştir. Çalışmada faj uygulamasının *Salmonella*'nın kümes içerisinde yayılmasını önlediği rapor edilmiştir (46).

Bakteriyofajların biyokontrol ajanları olarak kullanımı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, *E.coli* O157:H7 sayısını düşürücü etkisiyle fajlar oldukça etkili sonuçlar ortaya koymuştur (47, 48, 49). Domates, ıspanak gibi taze tüketilen ürünlerde deneysel olarak kontamine edilmiş *E.coli* O157:H7'nin biyokontrolü amacıyla gerçekleştirilen bakteriyofaj uygulamalarında, domateslerde 120 saat sonunda % 94 azalma görülürken, ıspanaklarda 24 saat sonunda % 100 oranında düşüş olduğu bildirilmiştir (47). ECP-100 faj karışımının marul ve taze kesilmiş kavunlarda uygulandığı bir çalışmada, sprey olarak uygulanan faj karışımının 4°C'de 2 gün depolama sonrasında *E.coli* O157:H7

sayısında önemli derecede azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (48). Benzer şekilde dekontamine edilen taze ıspanak ve marullarda uygulanan faj karışımı yardımıyla 10 dakika gibi bir süre içerisinde *E. coli* O157:H7 bakteri canlılığı tespit edilemediği rapor edilmiştir (49). Önemli patojenlerden olan *Salmonella typhimurium* PT160 ve *Campylobacter jejuni* inoküle edilerek 5°C ve 24°C'de depolanan çiğ etlerde ise, bakteriyofaj uygulamasında inkübasyon süresi boyunca azalma olduğu ve söz konusu azalmanın inkübasyon koşullarına bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (50). Bakteriyofajların biyokontrol ajanı olarak kullanımda etkinliğinin incelendiği bir başka çalışmada ise, çimlenen hardal ve brokoli tohumlarında farklı faj uygulamalarının ve karışım uygulamanın etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada faj A ve B karışımının uygulandığı tohumlarda *Salmonella* sayısında önemli derecede düşüş olduğu ifade edilmiştir (51). Elma ve kavunlarda faj karışımına kombine olarak uygulanan nisin ilavesinin *Listeria monocytogenes* sayısında meydana gelen azalmayı destekleyici etki gösterdiği bildirilmiştir. Bakteriyofaj uygulaması ile elma ve kavunlarda *Listeria* sayısında meydana azalma sırası ile 0.4 ve 4.6 log iken, bakteriyofaj ve nisin birlikte uygulandığında bu değerlerin sırası ile 2.3 ve 5.7 log olduğu rapor edilmiştir (52). Son dönemlerde yapılan çalışmalardan birinde ise, *Salmonella*'nın domuz derisi, tavukgöğsü ve yumurtalardaki gelişimi üzerine 3 farklı faj karışımının etkisi incelenmiştir. Çalışmada, en etkin azalma domuz derisinde sprey uygulama ile elde edilirken, kontamine tavukgöğüslerinde faj solüsyonuna 5 dakika daldırma metodu ile istatistiksel olarak önemli azalma görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmada yumurtalarda uygulanan sprey faj uygulaması da etkin bir sonuç verirken, söz konusu azalmanın domuz derisinde görülen azalmadan daha düşük olduğu rapor edilmiştir (53).

Biyokontrol ajanı olarak kullanımının yanı sıra tüketime hazır gıdalarda raf ömrünü uzatmaya yardımcı olan bakteriyofaj uygulamaları, çeşitli gıdalar üzerinde yapılan çalışmalarda biyopre-

zervasyon ajanı olarak da olumlu sonuçlar vermiştir. Farklı gıda örneklerinde (et, ıspanak) *E.coli* O157:H7 üzerine 3 farklı faj karışımının etkisi incelenmiştir. Araştırmada, 10^7 kob/ml düzeyinde kontamine edilen gıda örnekleri 4°C ve 24°C'de depolanmıştır. Et örneklerinde 4°C ve 24°C'de 24 saat depolama sonrası sırası ile 0.48 ve 1.97 logaritmik birim azalma olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada ıspanak örneklerinde başlangıç kontaminasyonu 10^7 kob/ml olan *E.coli* O157:H7 sayısının 24°C'de 24, 48 ve 72 saat depolama sonrasında sırasıyla 3.28, 2.88 ve 2.77 logaritmik birim azalma tespit edildiği bildirilmiştir (54). *Campylobacter* faj uygulamalarının araştırıldığı bir çalışmada, çiğ ve pişmiş sığır eti üzerine uygulanan fajların etkinliğinin etin çeşidine ve depolama koşullarına bağlı olarak değiştiği, hem çiğ hem de pişmiş sığır etlerinde önemli ölçüde azalma kaydedilmiştir (50). *Salmonella* üzerine yapılan araştırmalarda, *Salmonella* typhimurium'un tüketime hazır gıdalardaki kontrolünü sağlamak amacıyla FO1 ve E2 fajları araştırılmıştır. Çalışmada, kırmızı et ve çikolatalı sütün 8°C'de depolanan faj uygulamasında 3 logaritmik birim azalma saptanırken, 15°C'de depolamada 5 logaritmik birim azalma görüldüğü rapor edilmiştir (55). Bir başka araştırmada, çiğ ve pastörize süttten Cheddar peyniri üretiminde bakteriyofajların *Salmonella* enteritidis'in canlılığına etkisini tespit etmek amacıyla üretim ve depolama aşamalarında analizler gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofaj ilave edilmeyen sütlerden üretilen peynirlerde *Salmonella* sayısında artış gözlenirken, hem çiğ hem de pastörize süte faj ilavesinin *Salmonella* sayısını belirgin ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. 8°C'de depolanan ve pastörize süttten elde edilen peynirlerde 89 gün sonunda *Salmonella* varlığının tespit edilemediği bildirilmiştir (56). Tavuk derisinde *Salmonella* miktarını azaltıcı etkisini tespit etmek amacıyla çeşitli kimyasallarla bakteriyofaj uygulamalarının karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada, kümes hayvanlarında en önemli patojen olan ve gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet veren *Salmonella* ile kontamine tavuklarda yapılan analizlerde, bakteriyofaj uygulamasının kimyasal uygulamalar yerini alabilecek önemli bir alternatif olduğu vurgulanmıştır (57). Benzer bir çalışma ise, olgunlaştırılmış yumuşak beyaz peynirler ve kırmızı damarlı peynirlerde fajların kullanımı ile *Listeria monocytogenes*'in kontrolünü sağlamak amacıyla yapılmıştır. Araştırmada fajların

biyokontrol ajanı olarak kullanımının önemi vurgulanırken 22 günlük depolama sonunda *Listeria monocytogenes* sayısında 3 logaritmik birim azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (58). Tüketime hazır tavuklarda kısalabilir kuyruk morfolojisine sahip fajların biyoprezervasyon amacıyla kullanıldığı çalışmada, 5°C'de ve 30°C'de depolamalarda belirgin farklılıklar meydana geldiği gözlenmiştir. 30°C'de depolanan tavuklarda 2.5 logaritmik birim azalma görülürken, 5°C'de depolanan tavuklarda 21 gün sonunda *Listeria monocytogenes*'in gelişiminin engellendiği bildirilmiştir (59). Pastörize süt, taze ve sert tip peynirlerde *S.aureus*'un gelişimini önlemek amacıyla uygulanan faj çalışmasında ise, diğer patojenlere karşı elde edilen sonuçlara paralel sonuçlar alınmıştır. Pastörize sütte yapılan faj uygulamasında iki farklı başlangıç kontaminasyon seviyesinde faj ve yüksek hidrostatik basınç uygulamasının birlikte kullanımının kontaminasyon düzeyini azaltmada oldukça etkin olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 400 MPa basınç ile kombine kullanılan fajların, başlangıçta 10^4 ve 10^6 kob/ml olan *S. aureus* sayısını 10 kob/ml seviyelerine düşürdüğü ifade edilmiştir. Taze ve sert tip peynirlerde 10^6 kob/ml seviyesinde kontamine edilen pastörize sütlere yaklaşık 10^6 kob/ml litik faj karışımı ilave edilerek iki farklı tip peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Taze peynirlere uygulanan faj karışımı 3 saat içerisinde 3.83 logaritmik birim azalma sağlarken, 6 saat sonunda *S.aureus* sayısını tespit edilemeyecek kadar düşürmüştür (60, 61).

Gıdaların kontrolü olduğu kadar gıdalarla temas halinde bulunan ekipman ve yüzeylerin de temizliği büyük önem taşımaktadır. Gıda ile temas halinde bulunan alet ekipman ve yüzeylerin faj uygulamaları ile dezenfeksiyonu işlemine biyosanitasyon adı verilmektedir. Biyosanitasyon amacıyla yapılan çalışmalarda da, diğer faj uygulamalarına paralel sonuçlar alındığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada 10^6 , 10^5 ve 10^4 kob seviyelerinde *E.coli* O157:H7 ile kontamine edilen paslanmaz çelik, seramik ve yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE) yüzeylerde faj uygulaması ile önemli sonuçlar alındığı ifade edilmiştir. Çalışmada, farklı yüzeylere inoküle edilen patojenler 4, 12, 23 ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 37°C ve 12°C'de paslanmaz çelik yüzeylerde 10 dakika gibi kısa bir süre içerisinde patojen varlığı tespit edilemezken, 23°C'de 1 saatin sonunda aynı sonuca ulaşılmıştır. Seramik

yüzeylerde ise, 37°C'de 10 dakika, 23°C'de 1 saatten sonra benzer sonuç elde edilmiştir (62). Söz konusu çalışma kontamine sert yüzeylerde faj uygulamasının etkinliğini destekler nitelikte sonuçlar vererek bakteriyofajların biyosanitasyon ajanı olarak kullanımının önemini vurgulayan diğer çalışmaları da destekler niteliktedir (63).

SONUÇ

Bakteriyofajların tedavi, biyokontrol, biyosanitasyon ve biyoprezervasyon amaçlı kullanımına yönelik çalışmaların özellikle son yıllarda artış gösteriyor olmasının yanı sıra bu konu üzerine çalışan ticari firma sayısının da artması fajların antimikrobiyel yeteneklerinin oldukça yüksek olduğunun tespit edilmesinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde kimyasal koruyuculardan uzak durmaya çalışan tüketici profili için bakteriyofaj kaynaklı koruyucuların kullanımı daha güvenilir ve alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda pozitif sonuç alabilmek için ilk olarak fajların buldukları ortamdan doğru şekilde izole edilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle bakteriyofajların alternatif antimikrobiyel ajanlar olarak kullanımının etkin bir şekilde yaygınlaşmasını sağlamak için daha güvenli ve teknolojik çalışma ortamlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Brussow H, Kutter E. 2005. Phage Ecology. In: *Bacteriophages: Biology and applications, Florida*, pp. 129-163.
2. Coşkun, MY. 2003. Bakteriyofaj Tedavisi. *Bilim ve Teknik*. 474 (5): 82-85.
3. Ackermann HW. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol*, 152, 227-243.
4. Seçkin, AK., Baladura, E. 2010. Gıdaların Muhafazasında Bakteriyosin ve Bakteriyofaj Uygulamaları. *GIDA*, 35(6): 461-467.
5. Chibeu, A. 2013. Bacteriophages in food safety. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Formatex.
6. Wittebole, X., De Roock, S., Opal, SM. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5, 226-235.
7. Dewaal, CS., Grooters, SV. 2013. Antibiotic resistance in foodborne pathogens. *Center for Sci Publ Intrest*, May.
8. Sillankorva, SM., Oliverira, H., Azeredo, J. 2012. Bacteriophages and their role in food safety. *Int J Microbiol*, 863-945.
9. Temelli, S., Çetin, E. 2011. Gıdalarda Patojen Kontrolünde Bakteriyofaj Kullanımı. *Uludağ Üniv. J. Fac. Vet. Med.* 30(2), 45-52.
10. Loc-Carrillo, C., Abedon, ST. 2011. Pros and Cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1, 111-114.
11. Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, P., McAuliffe, O., Coffey, A. 2014. Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327-349.
12. Carvalho, CM., Santos, SB., Kropinski, AM., Ferreira, EC., Azeredo, J. 2012. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: *Campylobacter* and *Salmonella*. In: *Bacteriophages*, pp.180-214.
13. Huff, WE., Huff, GR., Rath, NC. 2002. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poult Sci*, vol. 81(4), 437-441.
14. Poshadri, A., Aparna, K. 2010. Microenkapsulation Technology: A Review. *J.Res. ANGRAU* 38(1), 86-102.
15. Çakır, İ. 2007. Fonksiyonel Gıda Bileşenleri ve Probiyotiklerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları. 5. Gıda Mühendisliği Kongresi, 08-10 Kasım, Ankara.
16. Ünal, E. ve Erginkaya, Z. 2010. Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu. *GIDA*, 35(4), 297-304.
17. Gouin, S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sci and Technol*, 15, 330-347.
18. Choinska-Pulit, A., Mitula, P., Sliwka, P., Laba, W., Skaradzinska, A. 2015. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Sci & Technol* 45, 212-221.
19. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Engineering*, 104 (4), 467-483.
20. Sakai, S. and Kawakami, K. 2010. Development of subsieve-size capsules and application to cell therapy. *Advances in Experimental Med and Biol*, 670, 22-30.

21. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40, 1107-1121.
22. Koç, M., Sakin, S. Ertekin, FK. 2010. Mikroenkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı. Pamukkale Üniversitesi. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 77-86.
23. Özcan, T. ve Altun, B. 2013. Süt Ürünlerinde Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu I: Enkapsülasyon Teknikleri. U. Ü. *Ziraat Fakültesi Dergisi* 27(2), 93-104.
24. Burgain, J., Corgneau, M., Scher, J. Gaiani, C. 2015. Encapsulation of Probiotics in Milk Protein Microcapsules. In: *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* Chapter 20. France, pp. 391-406.
25. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M, Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Engineering*, 104 (4), 467-483.
26. Li, R., Zhang, Y., Polk, DB., Tomasula, PM., Yan, F., Liu, L. 2016. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG *in vitro* and *in vivo* by a new encapsulation system. *J Control Release*, 230(28), 79-87.
27. Gökmen, S., Palamutoğlu, R., Sarıçoban, C. 2012. Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1), 36-50.
28. Venkata Naga Jyothi, N., Muthu Prasanna, P., Narayan Sakarkar, SK., Prabha, S., Seetha Ramaiah, P., Srawan, GY. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul*, 27(3), 187-197.
29. Campos, DC., Acevedo, F., Morales, E., Aravena, J., Amiard, V., Jorquera, MA. 2014. Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World J Microbiol and Biotechnol*, 30, 2371-2378.
30. Gbassi, GK. and Vandamme, T. 2012. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharm*, 4, 149-163.
31. O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *J Appl Microbiol*, 91, 1059-1066.
32. Müller-Merbach, M., Rauschner, T., Hinrichs, J. 2005. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int Dairy J*, 15, 777-784.
33. Matinkhoo, S., Lynch, KH., Dennis, JJ., Finlay, WH., Vehring, R. 2011. Spraydried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections. *J Pharm Sci*, 100, 5197-5205.
34. Vandenheuveel, D., Singh, A., Vandersteegen, K., Klumpp, J., Lavigne, R., Van den Mooter, G. 2013. Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections. *European J Pharm and Biopharm*, 84, 578-582.
35. Vandenheuveel, D., Meeus, J., Lavigne, R., Van den Mooter, G. 2014. Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix. *Int J Pharm*, 472, 202-205.
36. Golec, P., Dabrowski, K., Hejnowicz, M., Gozdek, A., Los, JM., Wegrzyn, G. 2011. A reliable method for storage of tailed phages. *J Microbiol Meth*, 88(3), 486-489.
37. Vonasek, E., Le, P., Nitin, N. 2014. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, 37, 7-13.
38. Dini, C., Islan, GA., de Urraza, PJ., Castro, GR. 2012. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: enhanced Protection against acidity and protease activity. *Macromolecular Biosci*, 12, 1200-1208.
39. Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, JR., Sabour, PM., Wang, Q. 2013. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Research Int*, 52, 460-466.
40. Mortazavian, A., Razavi, SH., Ehsani, MR., Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian J Biotechnol*, 5(1), 1-18.
41. Chen, M.J., Chen, K.N., 2007. Applications of probiotic encapsulation in Dairy Products. In: Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, *Blacwell Publishing*, U.S.A., pp. 83-112.
42. Carvalho, CM., Santos, SB., Kropinski, AM., Ferreira, EC., Azeredo, J. 2012. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: *Campylobacter* and *Salmonella*. In: *Bacteriophages*, Chapter 10, pp. 180-214.

43. Ma, Y., Pacan, J.C., Wang, Q., Sabour, P.M., Huang, X., Xu, Y. 2012. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloids*, 26, 434-440.
44. Murthy, K., Engelhardt, R. 2012. Stabilized bacteriophage formulations. *European Patent Appl*, 2, 462-940.
45. Raya, R.R., Oot, R.A., Moore-Maley, B., Wieland, S., Callaway, T.R. 2011. Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage*, 1(1), 15-24.
46. Lim, T.H., Lee, D.H., Lee, Y.N. 2011. Efficacy of bacteriophage therapy on horizontal transmission of *Salmonella Gallinarum* on commercial layer chickens. *Avian Diseases*, 55(3), 435-438.
47. Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A. and Sulakvelidze, A. 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl and Environ Microbiol*, 74(20) 6230-6238.
48. Sharma, M., Patel, J.R., Conway, W.S., Ferguson, S., Sulakvelidze, A. 2009. "Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce," *J Food Protect*, 72(7) 1481-1485.
49. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *Int J Food Microbiol*, 145(1), 37-42.
50. Bigwood, T., Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G.V., Heinemann, J.A. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol*, 25(2), 400-406.
51. Pao, S., Randolph, S.P., Westbrook, E. W., Shen, H. 2004. Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds. *J Food Sci*, 69(5), 127-130.
52. Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Protect*, 64(8), 1116-1121.
53. Spricigo, D.A., Bardina, C., Cortes, P., Lagostera, M. 2013. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol*, 16(5), 169-174.
54. Hong, Y., Pan, Y., Ebner, P.D. 2014. Meat Science and Muscle Biology Symposium: Development of bacteriophage treatments to reduce *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef products and produce. November 24.
55. Guenther S., Herzig O., Fieseler L., Klumpp J., Loessner M.J. 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int J Food Microbiol*, 154, 66-72.
56. Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., Griffiths, M.W. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J Food Protect*, 64(7), 927-933.
57. Hungaro, M.H., Santos Mendonca, R.C., Gouvea, D.M., Danata Vanetti, M.C., Oliveira Pinto, C.L. 2013. Use of bacteriophage to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food Res Int.*, 52, 75-81.
58. Guenther S., Loessner M.J. 2011. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage*, 1, 94-100.
59. Bigot, B., Lee, W.J., McIntyre, L. 2011. Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiol*, 28(8), 1448-1452.
60. Tabla, R., Martinez, B., Rebollo, J.E. 2012. Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments. *Int J Food Microbiol*, 156(3), 209-213.
61. Bueno, E., Garcia, P., Martinez, B., Rodriguez, A. 2012. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *Int J Food Microbiol*, 158(1), 23-27.
62. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *Int J Food Microbiol*, 145(1), 37-42.
63. Mahony, J., Auliffe, O.M., Ross, R.P., Sinderen, D., 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr. Opin. Biotech.*, 22, 157-163.

AUREOBASIDIUM PULLULANS İLE KSİLANAZ ÜRETİMİNE ETKİ EDEN BİYOPROSES PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ

Sırma YeğİN*

Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 05.05.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 19.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 22.06.2016

Özet

Ksilanazlar, gıda ve yem sektörlerinde çok yaygın olarak kullanılan enzimler arasındadır. Bu çalışmada, farklı *Aureobasidium pullulans* suşları ksilanaz üretimleri açısından taranmış ve ilgili suşlar arasında en yüksek enzim üretimi *A. pullulans* Y-2311-1 suşu ile elde edilmiştir. Söz konusu suş ile ksilanaz üretimi üzerine etkisi olan parametreler ve bu parametrelerin optimum değerleri belirlenmiştir. Maksimum enzim üretimi biyoprosesin dördüncü gününde elde edilmiştir. Enzim üretimi için optimum sıcaklık, başlangıç ortam pH'sı ve karıştırma hızı sırasıyla 28°C, pH 3.0 ve 200 rpm olarak belirlenmiştir. Enzim üretimi için en uygun azot kaynağı olarak maya ekstraktı tespit edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen enzim aktivitesi değeri 252.78 ± 23.08 U/ml'dir.

Anahtar kelimeler: Ksilanaz, *Aureobasidium pullulans*, biyoproses

DETERMINATION OF THE BIOPROCESS PARAMETERS EFFECTING XYLANASE PRODUCTION BY AUREOBASIDIUM PULLULANS

Abstract

Xylanases are one of the leading enzymes within the enzymes used in food and feed industries. In this work, different *Aureobasidium pullulans* strains have been screened for their ability to produce xylanase and *A. pullulans* Y-2311-1 was found to be the best strain for xylanase production within the strains tested. Effects of different cultivation parameters on xylanase production by this strain have further been evaluated. Maximum enzyme production was obtained at the fourth day of the bioprocess. The optimum levels of incubation temperature, initial medium pH and agitation speed were found as 28°C, pH 3.0 and 200 rpm, respectively. Yeast extract was determined as the most appropriate nitrogen source for xylanase production. Under optimized conditions the enzyme activity reached to 252.78 ± 23.08 U/ml.

Keywords: Xylanase, *Aureobasidium pullulans*, bioprocess

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ sirma.yegin@ege.edu.tr,

© (+90) 232 311 1921,

☎ (+90) 232 342 7592

GİRİŞ

Ksılan bitki hücre duvarının yapısında bulunan ve bir heteropolisakkarit olan hemselülozun temel bileşenidir. Ksılan temel zinciri birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarıyla bağlı beş karbonlu bir şeker olan D-ksiloz ünitelerinden oluşmaktadır. Söz konusu yapıda temel zincire bağlı çok sayıda yan zincir bulunmaktadır. Yan zincirde L-arabinofuranoz, D-glukuronik asit, 4-O-metil-D-glukuronik asit uniteleri ve asetil grupları yer alabilmektedir (1). Çok karmaşık bir yapıya sahip olması nedeniyle ksılanın tam olarak hidrolizi çok sayıda enzimin birlikte çalışmasını gerektirmektedir. Bu enzimlerden endo- β -1,4-ksilanaz (EC.3.2.1.8), ksılan temel zincirini rastgele olarak parçalayarak ksilooligosakkarit oluştururken β -ksilosidaz (EC.3.2.1.37) ise ksilooligosakkaritlerin ve ksilobiyozun indirgen olmayan uçlarına etki ederek ksiloz oluşturur. Bu temel iki enzim dışında, α -L-arabinofuranosidaz (EC.3.2.1.55), α -glukoronidaz (EC.3.2.1.139), asetil ksılan esteraz (EC.3.1.1.72), ferulik asit esteraz (EC.3.1.1.73) ve *p*-kumarik asit esteraz (EC.3.1.1.-) ise temel zincire bağlı yan grupların hidrolizinde etkilidir (2). Bu enzimler içinde endo- β -1,4-ksilanazlar temel zincire etki eden en önemli enzimlerdir. Genel olarak ksılanaz enzimi ifadesi kullanıldığında endo- β -1,4-ksilanazlardan söz edilmektedir.

Ksılanaz enziminin üretimi, saflaştırılması ve uygulamaları konusunda çok fazla çalışma gerçekleştirilmiştir (3). Bunun temel nedeni ksılanazların çok yaygın kullanım alanlarına sahip olmasıdır. Başta kâğıt endüstrisi olmak üzere, gıda, yem, tekstil ve ilaç gibi pek çok sektörde kullanılmaktadırlar (4). Ksılanazlar, gıda endüstrisinde en yaygın olarak fırın ürünleri formülasyonunda kullanılmaktadırlar. Ksılanazların özellikle ekmek formülasyonunda kullanılmasıyla nişasta dışında kalan diğer polisakkaritlerin (arabinoksilan) hidrolizine bağlı olarak hamurun reolojik özelliklerinde ve ekmek içi yapısında iyileşme gözlenirken ekmeğin spesifik hacminde artış sağlanabilmektedir. Meyve suyu sektöründe de ksılanazlar pektinazlarla birlikte berraklaştırma amaçlı kullanılmaktadırlar. Meyve suyundaki çözünmeyen polisakkaritlerin hidrolizi ile indirgen şeker miktarında artış sağlamaktadırlar. Böylelikle meyve suyunun filtrasyonu işlemi kolaylaşmakta ve verimde artış elde edilmektedir (3). Ksılanazlar, bira üretiminde arpanın yapısında bulunan uzun

zincirli arabinoksilanların parçalanmasına olanak sağlayarak arpanın hidrolize olmasını kolaylaştırmaktadırlar. Böylelikle vizkoziteyi düşürerek bulanıklığın azaltılmasına da katkıda bulunmaktadırlar (4). Ksılanazların büyük ölçüde kullanıldığı diğer bir alan da yem sektörüdür. Ksılanaz preparatları kanatlı yem katkısı olarak kullanılmaktadır. Etlik piliç üretiminde kullanılan tahıl bazlı yemlerin yapısında bulunan arabinoksilan antibesinsel faktör olarak kabul edilmektedir. Çünkü arabinoksilanın su tutma kapasitesi yüksek olup bağırsak viskozitesini arttırabilmektedir. Bu durumda çeşitli besinsel maddelerin emilimi azalmakta ve verilen besine oranla gerçekleşen ağırlık artışı daha az olmaktadır. Ksılanazların yem formülasyonuna eklenmesiyle birlikte su tutma kapasitesi yüksek olan polisakkaritler hidrolize edilerek bu sorunların büyük ölçüde ortadan kaldırılması mümkün olabilmektedir (3, 4). Diğer taraftan ksılanazlar; ksiloz, ksilo-oligomerler ve yapay bir tatlandırıcı olan ksilitol üretiminde de kullanılmaktadır. Ksilooligosakkaritler prebiyotik özellik göstermekte olup gıda, yem ve ilaç gibi endüstrilerde kullanım alanı bulmaktadırlar (5).

Ticari olarak ksılanaz üretimi mikrobiyal biyoprosesler yoluyla gerçekleştirilmektedir. Endüstriyel ksılanaz üretimi çoğunlukla *Aspergillus* sp. ve *Trichoderma* sp. suşlarına ait küfler ile gerçekleştirilmiştir. Ticari bakteri kaynaklı ksılanazlar da mevcut olup çoğunlukla *Bacillus* sp. suşları tarafından üretilmişlerdir (6). Genellikle küf kaynaklı ksılanazlar asidik karakterde olup gıda endüstrisi için daha uygundur. Bakteri kaynaklı ksılanazlar ise alkali karakter sergilemektedirler (7). Küfler yüksek enzim sentezleme kapasitesine sahip olmalarına rağmen söz konusu mikroorganizma grubu ile çalışılması morfolojilerinin yarattığı problemler nedeniyle bakterilere kıyasla daha zordur. Bu çalışmada polimorfik bir küf olan *Aureobasidium pullulans* ile ksılanaz üretimi gerçekleştirilmiştir. Söz konusu mikroorganizmanın maya benzeri morfoloji sergilemesi büyük bir avantajdır. Çalışma kapsamında farklı *A. pullulans* suşları ksılanaz üretimi açısından karşılaştırılmış, en yüksek düzeyde üretim sağlayan suş belirlenmiştir. Sonrasında bu suş ile ksılanaz üretimi üzerine etkili olan parametrelerin optimum düzeyleri tespit edilmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra bu koşullarda gerçekleştirilen üretime ait biyoproses profili elde edilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Mikrobiyal besin ortamı bileşenlerinden maya-azot bazı (yeast-nitrogen base) Difco Firması'ndan (BD Detroit, Amerika Birleşik Devletleri), ksilan (kayın ağacı ksilanı) BOC Science Firması'ndan (Shirley, Amerika Birleşik Devletleri) temin edilmiştir. Diğer tüm kimyasal malzemeler analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya) ve AppliChem (Darmstadt, Almanya) Firmaları'ndan temin edilmiştir.

Mikroorganizmalar ve kültür koşulları

A. pullulans DSM 2404 Alman Kültür Koleksiyonu'ndan (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 ve *A. pullulans* NRRL Y12,974 Amerikan Zirai Araştırma Servisi'nden (US Department of Agricultural Service) temin edilmiştir. *A. pullulans* P56 ise Prof. Dr. Triantafyllos Roukas (Aristotle Üniversitesi/Selanik-Yunanistan) tarafından sağlanmıştır.

A. pullulans DSM 2404 ve *A. pullulans* P56 PDA (Potato Dextrose Agar) ortamı üzerinde, *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 ve *A. pullulans* NRRL Y12,974 ise YM (Yeast Mold Media) ortamı üzerinde 4°C 'de saklanmıştır. Kültürler 3 haftada bir taze besi ortamına ekim yapılarak 25°C' de 3 gün geliştirilmiştir. YM ortamı bileşimi (g/L): maya ekstraktı 3, malt ekstraktı 3, pepton 5, glikoz 10 ve agar 20 şeklindedir.

Ksilanaz üretimi açısından farklı *A. pullulans* suşlarının değerlendirilmesi

Çalışmada 4 farklı *A. pullulans* suşu ksilanaz üretimleri açısından test edilmiştir. Söz konusu suşlar hem ksiloz hem de ksilan içeren sentetik üretim ortamlarında pH 5.0'da test edilmiştir. Çalışmada kullanılan besin ortamlarının bileşimi aşağıda verilmiştir (8).

Aşı kültürü bileşimi (g/L): Ksiloz 10, maya-azot bazı (yeast nitrogen base) 6.7, asparajin 2.0, KH₂PO₄ 5.0 (pH 5.0)

Üretim ortamı bileşimi (g/L): Ksiloz veya ksilan (kayın ağacı ksilanı) 10, maya ekstraktı 1.0, (NH₄)₂SO₄ 2.5, KH₂PO₄ 5.0 (pH 5.0)

Ortamlarının pH'sı HCl ve NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.

Söz konusu mikroorganizmalar her üretim öncesinde uygun besin ortamında (PDA veya

YM) 25°C' de 3 gün süreyle geliştirildikten sonra, kültürlerden yukarıda bileşimi belirtilen 50 ml'lik aşı ortamına (250 ml'lik erlenlerde) 2 öze dolusu ekim yapılmıştır. Aşı kültürü 28°C' de, 150 rpm çalkalama hızında 24 h süreyle inkübe edilmiştir. 24 h sonrasında aşı kültürü'nden üretim ortamına % 2 oranında ekim yapılmıştır. Üretim ortamları da 250 ml'lik erlenler içinde 50 ml ortam olacak şekilde hazırlanmıştır. Enzim üretimi 28°C'de, 150 rpm çalkalama hızında 7 gün süreyle gerçekleştirilmiş ve üretim ortamlarından her gün örnek (600 µl) alınmıştır. Fermantasyon ortamından alınan örnekler, 21500g değerinde 4°C' de ve 15 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş, üst faz alınarak enzim aktivitesi tayini yapılmıştır.

Ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerinin belirlenmesi

Biyoproses parametrelerinden; başlangıç ortam pH'sı, ortam sıcaklığı, karıştırma hızı ve farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkileri incelenmiştir. Üretim ortamı olarak ksilan içeren besin ortamı kullanılmıştır.

Farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton ve üre kullanılmıştır. Gerçekleştirilen denemelerde maya ekstraktının yerine alternatif olarak denenen azot kaynakları temel formülasyonda bulunan 1 g/L maya ekstraktı ile eşit azot temelinde kullanılmıştır. Bu amaçla azot oranları bilinen söz konusu maddelerin 1 g/L maya ekstraktının içeriğindeki azot miktarına denk oranda azot içeren miktarları ortam formülasyonunda kullanılmıştır (Çizelge 1).

Ksilanaz aktivitesi tayini

Ksilanaz aktivitesi dinitrosalisilik asit (DNS) metodu ile belirlenmiştir (9). Substrat olarak kayın ağacından (beechwood) elde edilen ksilan kullanılarak sitrat tamponu (50 mM, pH 5.2) içerisinde % 0.5' lik (w/v) çözeltisi hazırlanmıştır. 900 µl substrat ve 100 µl enzim örneği bir test tüpü içerisinde karıştırılmış ve su banyosunda 50°C' de, 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında karışım üzerine 1.5 ml DNS çözeltisi ilave edilerek karıştırılıp kaynamakta olan su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra 1 dakika soğuk suda bekletilerek hızla soğutulmuştur. Sonrasında örneklerin 540 nm'deki absorpsiyon değerleri spektrofotometre kullanılarak

Çizelge 1. Enzim üretiminde kullanılan azot kaynakları
Table 1. The nitrogen source utilized in enzyme production

Azot kaynağı Nitrogen source	Azot Nitrogen (%)	Ortama ilave edilen miktar The amount added into the medium formulation (g/L)
Maya ekstraktı Yeast extract	11.0	1.0
Mısır ıslatma suyu Corn steep liquor	6.44	1.71
Pepton Peptone	9.0	1.22
Tripton Tryptone	13.0	0.85
Üre Urea	46.67	0.24

kaydedilmiştir. Söz konusu her bir örneğe spesifik bir de kör deneme yapılmıştır. Kör deneme için enzim örneği, DNS çözeltisinin ilavesinden sonra eklenmiş olup bunun dışında örnek için uygulanan prosedür aynı şekilde izlenmiştir. Söz konusu enzim örnekleri 540 nm'de yaklaşık 0.6-0.7 arasında bir absorbans verecek şekilde sitrat tamponu (50 mM, pH 5.2) kullanılarak seyreltilmişlerdir.

Standart grafiğin hazırlanması için 2 mg/mL konsantrasyonunda stok ksiloz çözeltisi sitrat tamponu içerisinde (50 mM, pH 5.2) hazırlanmıştır. Söz konusu stok çözeltiden 0-75 µg ksiloz içeren çözeltiler seyreltme yoluyla elde edilerek örnek için yukarıda ifade edilen prosedür izlenmiş ve elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik oluşturulmuştur. Standart grafik kullanılarak enzim etkisi sonucu ortaya çıkan indirgen şeker miktarı serbest ksiloz cinsinden bulunmuştur. Enzim aktivite birimi (U/ml); belirtilen koşullarda (50°C ve pH 5.2) bir dakikada 1 µmol ksiloza eşdeğer gelen indirgen şekerleri serbest hale geçiren enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Örneklere ait enzim aktivitesi aşağıda belirtilen denklem ile hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = (X/150.13) * (1/5) * (1/0.1) * \text{SF} \quad (\text{Denklem 1})$$

X: µg ksiloz (Standartlar ile hazırlanan grafikten elde edilmiştir)

SF: Seyreltme faktörü

Protein tayini

Protein tayini Bradford metodu ile "Coomassie Plus™ Protein Assay Kit" (Pierce, Fischer Scientific, Schwerte, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Standart olarak BSA (Bovine serum albumin) kullanılmıştır.

Biyokütle tayini

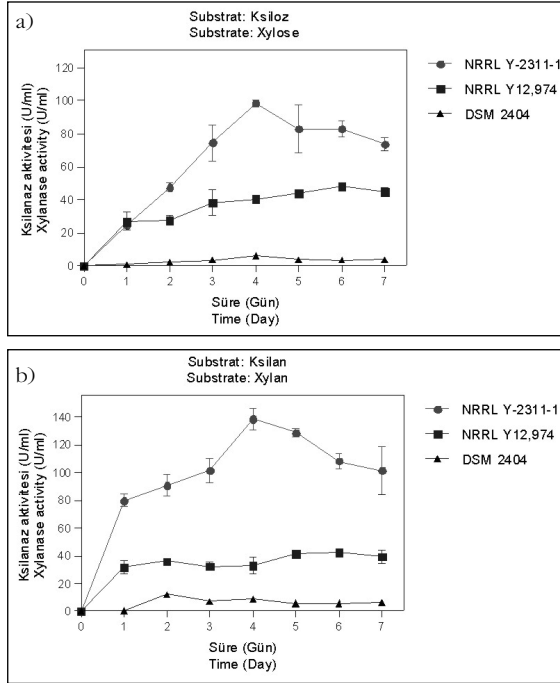
Fermantasyon ortamından alınan örnekler, 21500g değerinde 4°C' de ve 15 dakika süreyle santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve biyokütle fermantasyon sıvısından ayrılarak 80°C'de sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı *A. pullulans* suşlarının ksilanaz üretimi açısından taranması

Çalışmada 4 farklı *A. pullulans* suşu ksilanaz üretimleri açısından test edilmiştir. Söz konusu suşlardan, *A. pullulans* DSM 2404 siyah pigment üreten, *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 ve *A. pullulans* NRRL Y12,974 ise renkli pigment üreten suşlardır. *A. pullulans* P56 ise ultraviyole (UV) mutasyon ile elde edilmiş pigment üretimi zayıflatılmış bir suştur. Şekil 1a ve Şekil 1b 'de görüldüğü gibi, tüm suşlar için en yüksek enzim aktivitesi ksilan içeren üretim ortamlarında elde edilmiştir. İncelenen suşlar içerisinde en yüksek aktiviteyi *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 sağlamıştır. *A. pullulans* P56 ile gerçekleştirilen üretimlerde ise ksilanaz aktivitesi tespit edilmemiştir. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki kısmında *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 suşunun kullanılmasına karar verilmiştir.

A. pullulans NRRL Y-2311-1 için en yüksek aktivite her iki substrat için de biyoprosesin dördüncü gününde gözlenirken, *A. pullulans* NRRL Y12,974 için ise biyoprosesin üçüncü gününden itibaren enzim aktivite değerlerinde çok fazla bir değişikliğin olmadığı görülmektedir. *A. pullulans* DSM 2404 ksiloz kullanıldığında en yüksek enzim aktivitesi değerine biyoprosesin dördüncü gününde ulaşılırken ksilan kullanıldığında ise biyoprosesin ikinci gününde ulaşmıştır. Biyoproses



Şekil 1. Farklı *A. pullulans* suşları ile gerçekleştirilen ksilanaz üretimlerinin kinetiği: a) Substrat: ksiloz, 28 °C, 150 rpm ve pH 5.0; b) Substrat: ksilan, 28 °C, 150 rpm ve pH 5.0
Figure 1. Kinetics of xylanase production with different *A. pullulans* strains a) Substrate: xylose, 28 °C, 150 rpm and pH 5.0; b) Substrate: xylan, 28 °C, 150 rpm and pH 5.0

süresi arttıkça enzim sentezinde gözlenen düşüşün, ortamda bulunan ve mikrobiyel fizyoloji üzerinde etkisi bulunan makro ve mikro besin elementlerinin azalmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir. Söz konusu besin elementlerinin miktarlarındaki azalmanın, enzimin sentezlenme metabolizmasında inaktivasyona sebep olması mümkündür (10).

Leathers (11) tarafından yapılan bir suş tarama çalışmasında da taranan suşlar içerisinde en yüksek ksilanaz aktivitesini *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 suşunun gösterdiği belirtilmiştir. Mevcut çalışmada bu çalışmadan farklı olan *A. pullulans* suşları da incelenmiştir ancak taranan suşlar içinde en yüksek aktiviteyi yine *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 sağlamıştır. Başka bir çalışmada farklı karbon kaynaklarının siyah pigment üreten *A. pullulans* ATCC 20524 ile ksilanaz üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada karbon kaynağı olarak ksiloz kullanıldığında ksilanaz üretimi gerçekleşmezken ksilan kullanıldığında biyoprosesin beşinci gününde maksimum ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir (12).

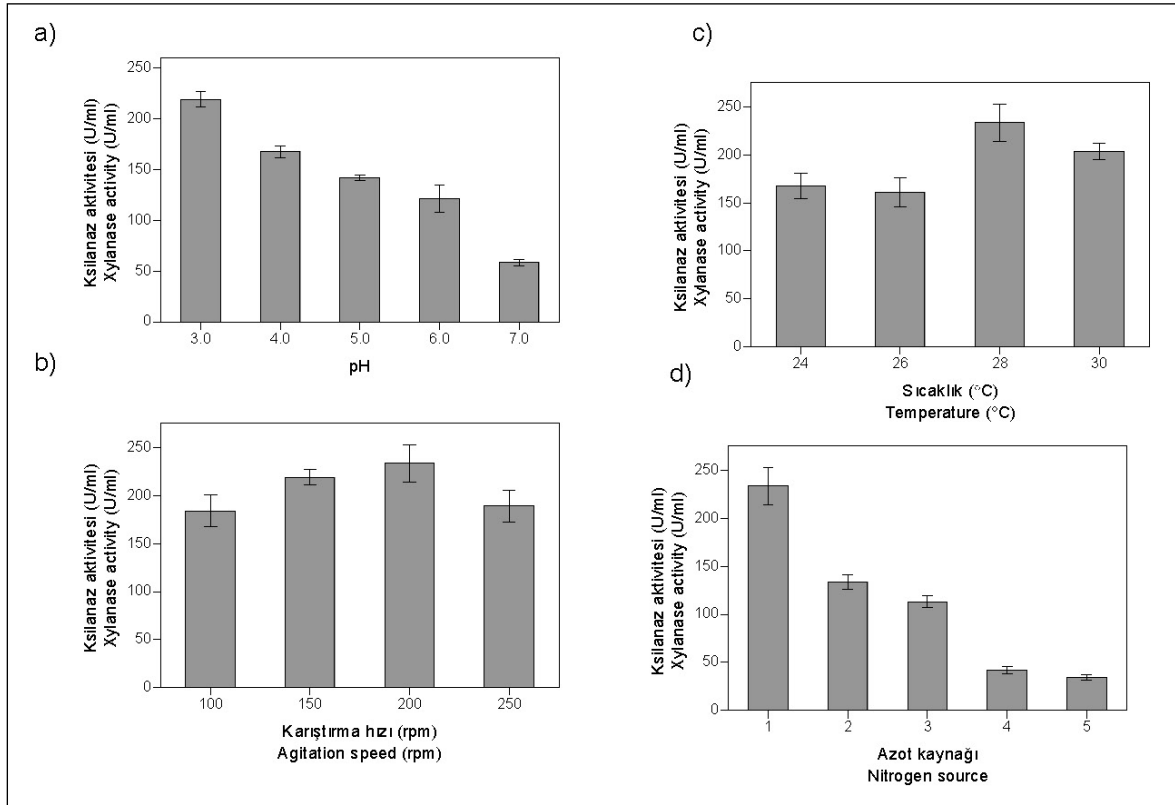
Başlangıç ortam pH'sının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Ksilanaz üretimini önemli ölçüde etkileyen biyoproses parametrelerinden biri ortam pH'sıdır. Başlangıç ortam pH'sının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda en yüksek enzim aktivitesi ortam pH'sı 3.0 (219.01 ± 7.91 U/ml) olduğunda gözlenmiştir (Şekil 2a). pH değeri arttıkça enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir.

Pek çok küf ve bakteri ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği önceki çalışmalar incelendiğinde ksilanaz üretiminin ortam pH'sına bağlı olarak önemli değişiklikler gösterdiği görülebilmektedir (13). *Penicillium sclerotiorum* ile saf yulaf ksilanı kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada en yüksek ksilanaz aktivitesi başlangıç ortam pH'sı 6.5 olduğunda elde edilmiştir (14). *Aspergillus foetidus* ile saf huş ağacı ksilanı kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ise pH 5.0 ile biyoprosese başlandığında ksilanaz üretiminde önemli ölçüde artış olduğu ifade edilmiştir (15). *Bacillus altitudinis* DHN8 ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada başlangıç ortam pH'sı 7.0 olduğunda en yüksek ksilanaz aktivitesi elde edilmiştir (16). Sonuç olarak; ksilanaz üretimi için optimum pH değeri kullanılan mikroorganizmaya ve kullanılan üretim ortamı kompozisyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Üzerinde önemle durulması gereken bir diğer konu da ortam pH'sının çalışılan mikroorganizmanın lignoselülozik yapıda bulunan ksilanın erişebilirliğini ve kullanılabilirliğini önemli ölçüde etkilediğidir. Bu durum özellikle üretim ortamı formülasyonlarında kompleks lignoselülozik substratlar kullanıldığında geçerlidir.

Karıştırma hızının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Karıştırma hızının enzim üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi için farklı karıştırma hızları kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda, en yüksek enzim aktivitesi değeri çalkalama hızı 200 rpm olduğunda gözlenmiştir (233.40 ± 19.22 U/ml). 200 rpm' in üzerindeki çalkalama hızı değerlerinde enzim aktivitesi değerinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 2b). Farklı mikroorganizmalarla gerçekleştirilen pek çok çalışmada maksimum ksilanaz aktivitesi karıştırma hızının 200 ila 250 rpm arasında olduğu değerlerde elde edilmiştir (13, 16,17).



Şekil 2. a) Başlangıç ortam pH'sının enzim üretimi üzerine etkisi (28°C, 150 rpm, 96 h); b) Karıştırma hızının enzim üretimi üzerine etkisi (28°C, pH 3.0, 96 h); c) Sıcaklığın enzim üretimi üzerine etkisi (200 rpm, pH 3.0, 96 h); d) Farklı azot kaynaklarının enzim üretimi üzerine etkisi (pH 3.0, 28°C, 200 rpm, 96 h, 1: Maya ekstraktı, 2: Mısır ıslatma suyu, 3: Pepton, 4: Tripton, 5: Üre)

Figure 2. a) Effect of initial medium pH on enzyme production (28°C, 150 rpm, 96 h); b) Effect of agitation speed on enzyme production (28°C, pH 3.0, 96 h); c) Effect of temperature on enzyme production (200 rpm, pH 3.0, 96 h); d) Effect of different nitrogen source on enzyme production (pH 3.0, 28°C, 200 rpm, 96 h, 1: Yeast extract, 2: Corn steep liquor, 3: Peptone, 4: Tryptone, 5: Urea)

Ortam sıcaklığının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Ortam sıcaklığı çalışılan mikroorganizmanın büyüme ve gelişimi için önemli olduğu kadar metabolit üretimi için de kritik bir parametredir. Bu doğrultuda, maksimum düzeyde enzim üretiminin gerçekleştiği ortam sıcaklığının belirlenmesi için 24°C, 26°C, 28°C ve 30°C olmak üzere dört farklı sıcaklık değerinde üretimler gerçekleştirilmiştir. Şekil 2c'de görüldüğü gibi 24°C ve 26°C' de benzer aktivite değerleri elde edilirken, maksimum aktivite 28°C' de (233.40 ± 19.22 U/ml) elde edilmiştir. 30°C'de ise enzim aktivitesinde (203.42 ± 8.48 U/ml) kısmi bir düşüş söz konusu olmuştur. Enzim üretimi sırasında yüksek biyoproses sıcaklıklarıyla indüklenen fizyolojik değişiklikler tam olarak anlaşılmasına rağmen yüksek sıcaklık değerlerinde mikroorganizmaların daha az sayıda, büyüme-gelişme ve diğer fizyolojik

prosesler için gerekli olan proteinleri öncelikli olarak sentezledikleri belirtilmiştir (18). Yüksek sıcaklıklarda, mikroorganizmaların fizyolojik prosesler için ihtiyaç duydukları proteinlerin sentezlenmesine öncelik vermeleri nedeniyle sıcaklık arttıkça ksilanaz üretiminde düşüş meydana gelmesi mümkündür.

Farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimi üzerine etkisi

Genel olarak hızlı metabolize edilebilir azot kaynakları enzim üretimini baskılamaktadır. Diğer taraftan çok kompleks azot kaynaklarının ortam formülasyonunda kullanımı da yapılarında bulunan safsızlıklar nedeniyle enzim üretiminde azalmaya ve/veya enzim inhibisyonuna sebep olabilmektedir (19). Çalışmada farklı azot kaynaklarının ksilanaz üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla maya ekstraktı, mısır ıslatma suyu, pepton, tripton ve üre kullanılmıştır. Şekil 2d'de görüldüğü gibi

en yüksek düzeyde enzim aktivitesi (233.40 ± 19.22 U/ml) azot kaynağı olarak maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmiştir. Pepton, tripton ve üre gibi kısmen daha kolay hidrolize olabilen azot kaynakları kullanıldığında enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir. Çalışma sonuçlarına paralel olarak ksilanaz üretimi üzerine etkisi incelenen azot kaynakları arasında en yüksek ksilanaz aktivitesinin maya ekstraktı kullanıldığında elde edildiğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 (20), mutant *Thermomyces lanuginosus* MC 134 (21) ve *Schizophyllum commune* (22) suşlarının kullanıldığı çalışmalar bu duruma örnek olarak verilebilir.

Optimum koşullarda gerçekleştirilen biyoprosesin profili

Ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerinin belirlenmesinin sonrasında optimum koşullarda (başlangıç ortam pH'sı: 3.0; karıştırma hızı: 200 rpm; sıcaklık: 28°C; azot kaynağı: maya ekstraktı) gerçekleştirilen enzim üretiminin kinetiği belirlenmiştir. 24 saat aralıklarla alınan örneklerde ksilanaz aktivitesi ve toplam protein analizleri yapılmış ve biyokütle miktarı belirlenmiştir. Çizelge 2'de görüldüğü üzere, maksimum ksilanaz aktivitesi (252.78 ± 23.08 U/ml) ve spesifik aktivite (7122.57 U/mg) biyoprosesin dördüncü gününde elde edilmiştir. Toplam protein miktarı 25.03 ± 1.31 µg/ml ila 36.95 ± 0.84 µg/ml arasında değişmiştir. Biyoproses süresi boyunca spesifik aktivite değerlerinin izlediği eğilim, ksilanaz aktivitesi değerinin izlediği eğilim ile yaklaşık olarak paralellik göstermektedir. Diğer taraftan biyokütle miktarının ilk günden sonra enzim üretiminin maksimum olduğu dördüncü güne kadar azalma gösterdiği sonrasında da sabit kaldığı görülmektedir. Fungal ksilanaz üretiminin logaritmik büyüme evresinin sonunda başladığı ve durağan faz evresi ve sonrasında maksimuma ulaştığı belirtilmiştir

(23). Benzer durumun bazı bakteriyel ksilanazlar için de geçerli olduğu çalışmalar mevcuttur. Ho (24) tarafından *Bacillus subtilis* ile farklı üretim ortamı formülasyonlarında ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada enzim üretiminin durağan fazın sonunda başladığı gösterilmiştir. Leathers (11) tarafından *A. pullulans* Y-2311-1 ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada da üretimin ilk 30 saati sonrasında biyokütle düzeyinin azaldığı sonrasında sabit kaldığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada maksimum ksilanaz üretimi biyoprosesin 70. saatinde elde edilmiştir. *A. pullulans* suşları ile pullulan üretimi ile ilgili olarak mikroorganizmanın azot limitasyonuna maruz kalması durumunda karbon kaynağının biyokütle üretimi yerine metabolit üretiminde kullandığı belirtilmiştir (25). Benzer şekilde *A. pullulans* suşları ile ksilanaz üretimi sırasında biyoprosesin başlangıcında (ilk 24 saat) azot kaynağının hızlı bir şekilde biyokütle oluşumunda kullanılması ve azot kaynağının azalmasının ardından karbon kaynağının ksilanaz üretiminde kullanılması olasıdır. *Bacillus circulans* (26) ve *Rhizopus oryzae* (27) ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalarda da biyoprosesin ilerleyen sürelerinde ksilanaz üretiminde artış gözlenirken biyokütle miktarında azalma tespit edilmiştir. Diğer taraftan ortam pH'sı da enzim ve biyokütle üretimi açısından kritik bir faktördür. Mikrobiyal büyümenin limitasyona uğradığı pH değerlerinde ksilanaz üretiminin artış gösterdiği belirtilmiştir (23). Biyoproses profili incelendiğinde pH değerinin ilk 24 h sonunda başlangıç pH'sının (pH 3.0) altına düştüğü ve sonrasında çok az artışlarla pH 2.60 değerinde biyoprosesin tamamlandığı görülmektedir. *Aspergillus fumigatus* ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada pH değerinin biyoprosesin ilerleyen aşamalarında 3.0'ın altına düşmesi ile ksilanaz üretiminde artış gözlemlendiği ifade edilmiştir (28).

Çizelge 2. Optimum koşullarda elde edilen biyoproses profili
Table 2. Bioprocess profile at optimum conditions

Süre (gün) Time (day)	Ksilanaz aktivitesi Xylanase activity (U/mL)	Protein (µg/mL)	Spesifik aktivite Specific activity (U/mg)	Biyokütle Biomass (g/L)	Ortam pH'sı Medium pH
1	123.22 ± 11.77	25.03 ± 1.31	4922.89	5.46 ± 0.06	2.42 ± 0.01
2	198.08 ± 12.36	32.02 ± 0.98	6186.13	4.65 ± 0.30	2.46 ± 0.01
3	233.29 ± 14.84	33.21 ± 2.95	7024.69	3.95 ± 0.07	2.46 ± 0.01
4	252.78 ± 23.08	35.50 ± 3.09	7122.57	3.55 ± 0.13	2.53 ± 0.01
5	243.79 ± 7.54	35.46 ± 2.01	6875.07	3.53 ± 0.21	2.56 ± 0.03
6	178.35 ± 14.13	33.01 ± 1.92	5402.91	3.50 ± 0.25	2.60 ± 0.01
7	163.86 ± 10.59	36.95 ± 0.84	4434.64	3.48 ± 0.17	2.60 ± 0.01

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ksilanaz üretimleri açısından taranan farklı *A. pullulans* suşları arasında en yüksek enzim üretimi *A. pullulans* Y-2311-1 suşu ile elde edilmiştir. Söz konusu suş ile ksilanaz üretimini etkileyen parametrelerin optimum düzeyleri tespit edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen enzim aktivitesi değeri 252.78 ± 23.08 U/ml olarak belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen enzim üretimi değeri genel olarak yüksektir. Ancak üretim ortamı formülasyonunda saf ksilan kullanılması üretim maliyetlerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu çalışma, söz konusu mikroorganizma ile ksilanaz üretimi için belirlenen optimum koşullarda ucuz ve bol bulunan lignoselülozik atıkların taranması ve düşük maliyetli farklı ortam formülasyonlarının oluşturulması için bir temel oluşturmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma "Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu" tarafından TÜBİTAK-TOVAG 112O521 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Elgharbi F, Hmida-Sayari A, Zaafouri Y, Bejar S. 2015. Expression of an *Aspergillus niger* xylanase in yeast: Application in breadmaking and in vitro digestion. *Int J Biol Macromol*, 79, 103-109.
2. Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanase. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 3-23.
3. Paes G, Berrin JG, Beaugrand J. 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnol Adv*, 30, 564-592.
4. Bajpai P. 2014. Xylanolytic enzymes, New York, Academic Press.
5. Juturu V, Wu JC. 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnol Adv*, 30, 1219-1277.
6. Dobrev GT, Pishtiyski IG, Stanchev VS, Mircheva R. 2007. Optimization of nutrient medium containing agricultural wastes for xylanase production by *Aspergillus niger* B03 using optimal composite experimental design. *Bioresour Technol*, 98, 2671-2678.

7. Kulkarni N, Shendye A, Rao M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol Rev*, 23, 411-456.
8. Christov LP, Myburgh J, Van Tonder A, Prior BA. 1997. Hydrolysis of extracted and fiber bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. *J Biotechnol*, 55, 21-29.
9. Bailey MJ, Bieleley P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol*, 23, 257-270.
10. Irfan M, Nadeem M, Syed Q. 2014. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* IR05 in solid-state fermentation. *J Radiat Res Appl Sci*, 7, 317-326.
11. Leathers TD. 1986. Colour variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. *Appl Environ Microbiol*, 52, 1026-1030.
12. Ohta K, Moriyama S, Tanaka H, Shige T, Akimoto H. 2001. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. melanigenum and sequence analysis of the encoding gene. *J Biosci Bioeng*, 92, 262-270.
13. Kumar A, Gupta R, Shrivastava B, Khasa YP, Kuhad RC. 2012. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. *J Mol Catal B: Enzym*, 74, 170-177.
14. Knob A, Carmona EC. 2008. Xylanase production by *Penicillium sclerotiorum* and its characterization. *World Appl Sci J*, 4, 277-283.
15. Shah AR, Madamwar D. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem*, 40, 1763-1771.
16. Adhyaru DN, Bhatt NS, Modi HA. 2014. Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. *Biocatal Agric Biotechnol*, 3, 182-190.
17. Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 326-338.

18. Gawande PV, Kamat MY. 1999. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J Appl Microbiol*, 87, 511-519.
19. Bajaj BK, Khajuria Y P, Singh VP. 2012. Agricultural residues as potential substrates for production of xylanase from alkali-thermotolerant bacterial isolate. *Biocatal Agric Biotechnol*, 1, 314-320.
20. Su Y, Zhang X, Hou Z, Zhu X, Guo X, Ling P. 2011. Improvement of xylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* SDYKY-1 using response surface methodology. *New Biotechnol*, 28, 40-46.
21. Kumar KS, Manimaran A, Permaul K, Singh S. 2009. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *J Biosci Bioeng*, 107, 494-498.
22. Haltrich D, Steiner W. 1994. Formation of xylanase by *Schizophyllum commune*. Effect of medium components. *Enzyme Microb Technol*, 16, 229-235.
23. Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, Steiner W, Silvia Zupancic S. 1996. Production of fungal xylanase. *Bioresour Technol*, 58, 137-161.
24. Ho HL. 2015. Xylanase production by *Bacillus subtilis* using carbon source of inexpensive agricultural wastes in two different approaches of submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF). *J Food Process Technol*, 6: 437, doi:10.4172/2157-7110.1000437
25. Sheng L, Zhu G, Tong Q. 2014. Comparative proteomic analysis of *Aureobasidium pullulans* in the presence of high and low levels of nitrogen source. *J Agric Food Chem*, 62, 10529-10534.
26. Bocchini DA, Oliveira OMMF, Gomes E, Da Silva R. 2005. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Proces Biochem*, 40, 3653-3659.
27. Bakir U, Yavascaoglu S, Guvenc F, Ersayin A. 2001. An endo- β -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb Technol*, 29, 328-334.
28. Bailey MJ, Viikari L. 1993. Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan based media. *World J Microbiol Biotechnol*, 9, 80-84.

TÜRKİYE'DE FARKLI COĞRAFI YÖRELERDE ÜRETİLEN KALİTE KALECİK KARASI KIRMIZI ŞARAPLARININ DUYUSAL TANIMLAYICILARININ BELİRLENMESİ

Merve Darıcı, Turgut Cabaroğlu*

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

Geliş tarihi / Received: 19.06.2016
Kabul tarihi / Accepted: 29.06.2016

Özet

Bu çalışmada farklı rekolte (2010, 2011, 2012, 2013) yıllarına ait Kalecik/Ankara ve Güney/Denizli yöresi Kalecik Karası (KK) şaraplarının duyuşal tanımlayıcılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Duyusal değerlendirmede Tanımlayıcı Duyusal Analiz (DA) yöntemi kullanılmış ve sonuçlar Temel Bileşen Analiz (PCA) ile değerlendirilmiştir. Örnekler ülkemizde kontrollü koşullarda üretim yapan ve verim kontrolü sağlayan şarap üreticilerinden sağlanmıştır. DA ve PCA sonucunda Kalecik karası şaraplarının en baskın ortak aroma ile ilgili duyuşal tanımlayıcıları kırmızı meyve, siyah meyve ve kuru meyve kokuları olmuştur. Ankara yöresi şaraplarında kırmızı meyve, çiçek ve baharat kokuları Denizli yöresi şaraplarına göre daha baskın bulunurken, Denizli yöresi şaraplarında kuru meyve ve marmelat kokuları daha ön plana çıkmıştır. Panelistler kırmızı meyve karşılığı olarak vişne, çilek, kırmızı erik, ahududu kokusunu, siyah meyve olarak bektâşi üzümü, böğürtlen, yaban mersini kokusunu, kuru meyve olarak kuru erik, kuru üzüm ve kuru incir kokularını tanımlamışlardır. Duyusal analiz verilerine uygulanan PCA sonucunda genç Kalecik karası şaraplarının kırmızı meyve, siyah meyve, çiçek, renk, genel izlenim, gövde ve kompleks kriterleri ile korele iken, Yıllanmış şaraplar ise kuru meyve, vanilya, baharat, çikolata, marmelat gibi kriterler ile korelasyon göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Kalite, Kalecik Karası, şarap, duyuşal, DA, PCA

DETERMINATION OF SENSORY DESCRIPTORS OF QUALITY KALECİK KARASI WINES PRODUCED FROM DIFFERENT GEOGRAPHIC REGIONS IN TURKEY

Abstract

In this study, sensory descriptors of Kalecik Karası (KK) wines belong to different vintages (2010, 2011, 2012, and 2013) from two different geographic regions of Kalecik/ Ankara and Güney/ Denizli were aimed to investigate. Sensory evaluation was carried out by Descriptive Sensory Analysis (DA) method. Principal Component Analyses (PCA) was used to evaluate the sensory data. Samples have been provided from the winery that made production under controlled conditions with yield control. In consequence of DA and PCA, main dominant attributes of KK wines were red fruit, dark fruit and dry fruit odors. In Ankara wines; red fruit, flowery and spicy notes were more dominant whereas In Denizli wines; dry fruit and marmalade notes were dominant. Panelist were refers to cherry, strawberry, red plum and raspberry odors as a red fruit descriptive; gooseberry, blackberry and blueberry odors as a dark fruit descriptive and plum, raisin and fig odors as a dry fruit descriptive. As a result of Principal Component Analyses (PCA) in sensory evaluations, young KK wines has shown positive correlation with red fruit, dark fruit, flowery, color, body, complexity and harmony attributes whereas aged KK wines has shown positive correlation with dry fruit, vanilla, spices, chocolate and jam attribute.

Keywords: Quality, Kalecik Karası, wine, sensory, DA, PCA

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tcabar@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 61 73/2172,

☎ (+90) 322 338 6614

GİRİŞ

Türkiye gerek alan gerekse üzüm üretimi bakımından Dünya'nın önde gelen bağcı ülkeleri arasındadır. Bağcılık ürünleri içerisinde şarap, katma değeri en yüksek üründür. Ülkemizde turizm sektörünün hızla gelişmesi ve son yıllarda Dünya şarap piyasasının keşfedilmemiş tatlara açık olması yakın gelecekte Türk şarap sektörü açısından fırsat olarak kabul edilmektedir. AB ile müzakere aşamasında olan Türkiye, bağcılık ve şarapçılık alanında AB mevzuatını uyumlaştırmayı kabul etmiştir. Ancak bunun gereklerini henüz yerine getirememiştir. Öncelikle Türk şarap sektörünün Dünya ile rekabet edebilmesi için kaliteye önem vermesi gerekmektedir. Bu noktada Türkiye'nin bir an önce AB de uygulanan coğrafi bölge (terroir) esaslı kalite şarap sınıflandırmasını yapması ve "Kökene Kontrollü İsimlendirme" sistemine geçmesi gerekmektedir.

Yöresel farklılıklar asmanın gelişimi, üzümün olgunlaşması, bileşimi ve şarabın bileşimi ve duyuşal özelliklerini etkilemektedir. Bazı yüksek kalite şaraplar karakteristik özelliklerini yetiştirdiği bölgeden almaktadır. Şarap biliminde özellikle şarabın kaynağının belirlenmesi gerektiğinde şaraptaki kimyasal bileşenler ve bunlar arasındaki farklılıklar çok büyük önem kazanmaktadır (1). Şarap organik olduğu kadar inorganik bileşiklerin de bulunduğu ve bunların birçok değişken faktörlerle etkilendiği kompleks bir karışımdır. Bu faktörler bağda başlar ve son olarak şişeye kadar devam eder.

Şaraba referans olan kalite sübjektif bir terimdir ve belirlenmesi güçtür. Şarap kalitesi kavramı, zaman içinde değişir ve bir bağ bölgesinden diğerine farklılık gösterir. Ancak kaliteyi etkileyen faktörleri belirlemek için birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (2, 3). Kaliteyi belirleyen en önemli faktörlerden biri aromadır. Şarabın aromatik yapısı komplekstir ve bir çok aroma bileşiğinin varlığından kaynaklanır. Bu da şaraba farklı bir değer katar (4). Şaraplarda tüketici tercihinde temel rol oynayan duyuşal algımanın içinde aromanın önemli bir yeri vardır. Bu maddeler genel olarak burun ve geniz yoluyla algılanır ve lezzet üzerinde etkili olurlar. Aroma maddelerinin en önemli özellikleri çok az miktarda bile duyuşal olarak algılanmaları ve kalite üzerinde belirleyici rol oynamalarıdır. Şaraplarda kalite parametrelerini belirlemek için duyuşal analiz

teknikleri yoğun olarak kullanılmaktadır. Duyusal değerlendirmede lezzet ve aroma profili analizleri kullanılmaktadır. Böylece şarabın karakteristik özellikleri ortaya çıkmaktadır. Bir şarabın karakteristik yapısı ve duyuşal tanımlayıcıların ortaya konması şarabın kalite kategorisinin veya coğrafi bölgesinin sertifikasyonunda ve tanımlanmasında oldukça yararlı olabilir (5).

Türkiye'nin kaliteli kırmızı şarap veren en önemli üzüm çeşitlerinden biri Kalecik Karası'dır. Kalecik Karası Ankara kökenlidir. Fakat son dönemde bu çeşit bu bölgenin dışında Denizli gibi bölgelerde de yetiştirilmeye başlanmıştır. Son yıllarda bu çeşitten üretilen şaraplar uluslararası alanda Türkiye'yi iyi bir şekilde temsil etmektedirler.

Bu çalışmada iki farklı coğrafi yörede (Kalecik/Ankara-Güney/Denizli) üretilen Kalecik Karası şaraplarının Lezzet Profil Analizi ve Aroma Profil Analizi ile duyuşal tanımlayıcılarının ve yörenin etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada Kalecik/Ankara ve Güney/Denizli yörelerine ait coğrafi bölgelerden elde edilen Kalecik Karası şarapları kullanılmıştır (Çizelge 1). Örnekler ülkemizin önde gelen şarap üreticilerinden sağlanmıştır. Örnekleme 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada kullanılacak kırmızı şarap örneklerinin seçiminde;

-Şarapların üretim tekniğine (serbest sıradan elde edilen, yıllandırma potansiyeline sahip)

-Coğrafi kaynağına,

-%100 tek çeşit olmasına ve

-Üzüm yetiştirme tekniğine (birim alana verim) dikkat edilmiştir.

Şaraplarda Yapılan Analizler

Şaraplarda yoğunluk, alkol, toplam asit, pH, uçar asit, toplam fenolik bileşikler, antosiyanin, serbest ve toplam kükürt dioksit ve kuru madde analizleri Uluslararası Bağcılık ve Şarapçılık Ofisinin (OIV) şarap analiz metotlarına göre yapılmıştır (6).

Şaraplarda L*, a*, b* renk değerleri Hunter Lab renk ölçüm cihazı ile ölçülmüştür. L*, a*, b*

Çizelge 1. Kalecik Karası şarap örnekleri ve kodları
Table 1. Samples and Codes of Kalecik Karası Wines

Kod Code	Yıl Year	Firma Kodu* Firm Code	Yöre Province
KDL-A11	2011	A1	Kalecik/Ankara
KDL-A12	2012	A2	Kalecik/Ankara
KK-A11	2011	B1	Kalecik/Ankara
KK-A12	2012	B2	Kalecik/Ankara
KMT-D10	2010	C1	Güney/Denizli
KMT-D11	2011	C2	Güney/Denizli
KMT-D12	2012	C3	Güney/Denizli
KD-D12	2012	D1	Güney/Denizli
KD-D13	2013	D2	Güney/Denizli
KP-D11	2011	E1	Güney/Denizli
KP-D12	2012	E2	Güney/Denizli

*aynı sütunda yer alan her harf farklı bir firmayı temsil etmektedir.

* different letters in the same column indicate different firms.

değerleri 3 boyutlu koordinat sistemi ile verilmekte ve bu koordinat sisteminde L* değeri dikey ekseninde parlaklıktan koyuluğa gidişi belirtirken +a* kırmızılığa, -a* yeşillığe, +b* sarılığa, -b* ise maviliğe gidişi göstermektedir. Ayrıca bu ölçümlere ilave olarak rengi tanımlamak için Croma değeri (C, renk yoğunluğu, $\sqrt{a^{*2}+b^{*2}}$) ve Hue açısı (renk tonu, $\arctan b^*/a^*$) değerleri hesaplanmıştır (7).

Tanımlayıcı Duyusal Analizler (DA)

Şarapların duyusal profillerini belirleyebilmek için aroma ve lezzet profil analizleri uygulanmıştır (8, 9). Analizler Kavaklıdere Şarapları /Mey Alkollü İçkiler duyusal analiz ekibi ve Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü duyusal analiz ekibi ile yaşları 23-55 arasında değişen 12 kişilik bir panelist grubu tarafından gerçekleştirilmiştir. Aroma Profil Analizi için; Panelistlere 2 saat süren 7 farklı oturum uygulanmış, ilk oturumda, panelistlerin aroma terimlerini tanıması sağlanmıştır.

Bu oturumlar kapsamında panelistlere her bir duyusal terime örnek verilebilecek standartlar sunularak bu aroma bileşiklerini tanımaları sağlanmıştır. İkinci oturumda ise panelistlerin kırmızı şaraplar için genel olarak kullanılan (tatlılık, ekşilik, acılık, burukluk, kalıcılık, genel izlenim) lezzet terimlerine karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Üçüncü çalışma oturumunda, panelistlere, farklı konsantrasyonlarda aroma standartları sunulmuş ve panelistler tarafından tartışılarak en yüksek ve en düşük referans değerler belirlenmiştir. Dördüncü oturumda ise panelistlere, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış lezzet terimlerini temsil eden standart çözeltiler sunulmuş ve panelistlerden konsantrasyonlarına göre sıralamaları istenmiştir ve böylece en yüksek ve en düşük konsantrasyon referansları belirlenmiştir. Beşinci oturumda ise panelistler Kalecik Karası kırmızı şarapları için kullanılacak tanımlayıcı terimleri ve standartları (Çizelge 2) belirlemiştir.

Çizelge 2. Tanımlayıcı duyusal analiz için seçilen koku tanımlayıcıları ve ilgili referans standartların kompozisyonu
Table 2. Odor Descriptors and related references standards in Descriptive Sensory Analysis

Tanımlayıcılar Descriptors	Referans Standartlara Reference Standards
Kırmızı Meyve	2 gr vişne, kırmızı erik, çilek, ahududu parçaları karışımı
Siyah Meyve	2 gr siyah erik, frenk üzümü, dut, yabanmersini parçaları karışımı
Kuru Meyve	2 gr kuru incir, kuru üzüm, kuru erik parçaları karışımı
Marmelat	1 gr erik ve vişne marmelatı karışımı
Çiçeksi	1 tane menekşe çiçeğinin yaprakları
Baharat	0.5 gr tarçın, hindistan cevizi, karanfil karışımı
Şekerleme/Lolipop	0.5 gr kırmızı, yeşil, sarı renkli jelibon parçaları karışımı
Çikolata/Mocha	1 gr siyah çikolata parçaları ve 0,5 gr hazır mocha kahve tozu
Vanilya/Ağaçsı	1 damla vanilya esansı ve 2 adet küçük fıçı parçası

^a Miktarlar spesifik olarak 30 mL nötr genç kırmızı şaraba ilave edilmiştir.

^a Addition of 30 mL neutral young red wine

Bu oturum sonunda son oturumlarda kullanılacak terimler kesinleştirilmiştir. Son olarak altıncı ve yedinci oturumlarda, panelistler her bir tanımlayıcı için şarapları 15 puanlık skala kullanarak değerlendirmiştir (10). Her iki oturumda, şaraplar (20 ml ve 20 °C) kodlanmış lale şeklindeki şarap bardaklarında rastgele bir düzende servis edilmiştir.

İstatistiksel Analizler

Çalışmada duysal analiz sonuçlarına yörenin etkisini görebilmek için varyans analizi uygulanmıştır. Ayrıca, duysal verilere Temel Bileşen Analizi uygulanarak şarapların karakteristiğini gösteren duysal tanımlayıcılar belirlenmiştir (8).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kalecik Şaraplarının Kimyasal Bileşimi

Ankara ve Denizli yöreleri Kalecik Karası şaraplarının kimyasal bileşimleri, minimum, maksimum, ortalama değerleri ve bileşim üzerine yörenin etkisi Çizelge 3' de verilmiştir.

Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarının alkol oranları hacmen %13.1 ile %14.1 arasında değişmiş ve ortalama %13.5 bulunmuştur. Denizli yöresi

şaraplarının alkol oranları hacmen %12.7 ile 14.0 arasında değişmiş ve ortalama %13.5 bulunmuştur. Her iki yöre karşılaştırıldığında ortalama alkol miktarları aynı bulunmuştur. Alkol miktarları arasındaki fark üzümlerdeki şeker miktarı ile ilgilidir. Bu değerler üzerinden Denizli yöresi üzümlerinin şeker miktarı bakımından Ankara yöresi üzümlerinden farklı olmadığı söylenebilir. Şaraplarda alkol miktarının hacim olarak % 8-17 arasında değiştiği, kırmızı şaraplarda bu oranın genellikle % 11-14 arasında olduğu ve şarabın dayanıklılığı açısından etil alkol oranının hacmen %10'un altına düşmemesi gerektiği bildirilmiştir (11).

Ankara yöresi şaraplarının toplam asit miktarları tartarik asit cinsinden 4.9-5.2 g/L arasında değişmiş ve ortalama 5.1 g/L bulunmuştur. Denizli yöresinde ise toplam asit 4.0-5.4 g/L değerleri arasında değişmiş ve ortalama 4.7 g/L bulunmuştur. İki yöre şarapları karşılaştırıldığında Ankara yöresi şaraplarının toplam asit miktarları daha yüksek bulunmuş ancak farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlenmiştir. Sek şaraplarda toplam asit miktarı tartarik asit cinsinden 4.5 g/L ile 9 g/L arasında değişir (12). Asitlik şarabın tat ve dayanıklılığı üzerine etkilidir. Ayrıca şaraba tazelik

Çizelge 3. Kalecik/Ankara ve Güney/Denizli yöresi Kalecik Karası şaraplarının genel bileşimi
Table 3. Composition of Kalecik Karası Wines produced from Kalecik/Ankara and Güney/Denizli province

	Kalecik/Ankara				Güney/Denizli				Genel General				
	Ort Mean	SD	Min	Maks	Ort Mean	SD	Min	Maks	'F	Ort Mean	SD	Min	Maks
Yoğunluk(g/L) Density	0.9903	0.001	0.9894	0.9909	0.9908	0.001	0.9891	0.9921	ö	0.9906	0.001	0.9891	0.9921
Alkol(°) Alcohol	13.5	0.4	13.1	14.1	13.5	0.4	12.7	14.0	ö	13.5	0.4	12.7	14.1
Toplam asit (g/L) ^a Total Acidity	5.1	0.2	4.9	5.2	4.7	0.5	4.0	5.4	ö	4.8	0.5	4.0	5.4
pH pH	3.8	0.1	3.6	3.9	3.8	0.3	3.3	4.4	ö	3.8	0.3	3.3	4.4
Uçar asit (g/l) ^b Volatile Acidity	0.5	0.2	0.3	0.7	0.3	0.1	0.3	0.5	ö	0.4	0.1	0.3	0.7
T. fenolik b. (mg/L) ^c T. Fenolic C.	1032.7	119.4	864.5	1137.3	1289.2	355.3	710.0	1755.5	ö	1196.0	311.1	710.0	1755.5
Antosiyanin (mg/L)	109.8	27.8	76.1	135.2	91.1	62.5	25.4	203.9	ö	97.9	51.6	25.4	203.9
Tanen (g/L)	1.9	0.4	1.5	2.2	1.8	0.4	1.1	2.4	ö	1.8	0.4	1.1	2.4
L*	13.1	6.1	7.2	20.6	7.0	2.6	4.1	11.2	**	9.2	5.0	4.1	20.6
a*	31.19	4.23	25.41	35.55	24.43	2.12	21.03	27.12	***	26.89	4.44	21.03	35.55
b*	12.13	2.11	9.03	13.69	10.17	4.35	6.23	18.20	ö	10.88	3.70	6.23	18.20
Hue açısı (°) Hue	21.17	1.27	19.56	22.64	21.91	6.78	16.50	33.87	ö	21.64	5.31	16.50	33.87
Kroma (C*) Croma	33.48	4.67	26.97	38.09	26.63	3.56	21.93	32.66	**	29.12	5.11	21.93	38.09
Serbest SO ₂ (mg/L) Free SO ₂	14.1	3.6	9.6	17.9	11.3	4.9	5.8	18.0	ö	12.3	4.5	5.8	18.0
Toplam SO ₂ (mg/L) Total SO ₂	48.4	27.1	22.4	86.4	43.9	18.1	19.2	76.8	ö	45.5	20.5	19.2	86.4
Kurumadde (g/L) Dry Matter	16.9	2.9	14.9	21.2	17.4	2.4	15.9	22.6	ö	17.2	2.4	14.9	22.6

^aTartarik asit cinsinden, ^bAsetik asit cinsinden, ^cGallik asit cinsinden; Ortalama, Kalecik/Ankara ve Güney/Denizli yörelerinden örneklenen Kalecik Karası şaraplarının ortalama değerlerini; Genel, Türkiye'de üretilen Kalecik Karası şaraplarının ortalama değerlerini; Min., değerler arasındaki minimum değeri; Maks., değerler arasındaki maksimum değeri göstermektedir; SD, Standart sapma; 'F: varyans analizine göre bölgenin etkisi; ö: önemli değil, *P<0.1 **P<0.05 ***P<0.01 düzeyinde önemlidir.

^aIn terms of tartaric acid, ^bIn terms of acetic acid, ^cIn terms of gallic acid; Min., value of Minimum; Maks., value of maximum; SD, standart deviation; F; significance at which means differ as shown by analysis of variance; ö.: not important, Important at the *P <0.1 **P <0.05 ***P <0.01 level.

kazandırır ve renk tonu üzerinde etkili olur (13). Her iki yöreye ait şarapların ortalama pH değerleri aynı olup 3.8 olarak bulunmuştur. Şaraplarda pH değeri 2.7 ile 3.8 arasında değişir (13).

Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarının toplam fenolik bileşik miktarları 864.5-1137.3 mg/L arasında değişmiş ve ortalama 1032.7 mg/L bulunmuştur. Denizli yöresi Kalecik Karası şaraplarının toplam fenolik bileşik miktarı 710.0-1755.5 mg/L değerleri arasında değişmiş ve şarapların ortalama toplam fenolik bileşik miktarı 1289.2 mg/L bulunmuştur. Her iki yöre karşılaştırıldığında Denizli yöresi Kalecik Karası şaraplarının toplam fenolik bileşik miktarları Ankara’ya göre daha yüksektir. Ancak iki bölge arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Toplam fenolik bileşik miktarlarındaki bu farklılıklar farklı iklim koşullarından, şarap üretimi sırasında uygulanan teknolojik işlemlerden ve yıllandırmadan kaynaklanmış olabilir. Fenolik bileşikler özellikle kırmızı şarapların rengi ve lezzeti üzerinde etkili olan önemli bileşiklerdir (13).

Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarının antosiyanin miktarları 76.1-135.2 mg/L arasında değişmiş ve ortalama 109.8 mg/L bulunmuştur. Denizli yöresi Kalecik Karası şaraplarının antosiyanin miktarları 25.4-203.9 mg/L arasında değişmiş ve ortalama antosiyanin miktarı 91.1 mg/L bulunmuştur. Her iki yörenin şarapları karşılaştırıldığında Ankara yöresi şaraplarının antosiyanin miktarları daha yüksek bulunmuş, ancak fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Benzer sonuçlar Kelebek ve ark. (2011) tarafından da belirlenmiştir (14). Antosiyaninler siyah üzümlerdeki kırmızı renk pigmentleridir ve genellikle kabukta bulunurlar. Üzüm kabuğundaki antosiyaninler şarap üretimi sırasında uygulanan maserasyon işlemi ile kabuktan şıraya geçer ve kırmızı şaraba rengini verirler (13). Genç şaraplarda antosiyanin miktarı başta çeşit olmak üzere değişik faktörlere bağlı olarak 100 ile 1500 mg/L arasında değişir. Şarap yıllandıkça antosiyanin miktarı da azalır. Antosiyaninler diğer bileşiklerle (tanen, tartarik asit, şekerler gibi) kondensasyona eğilimlidirler. Şarapta antosiyanin-tanen kopigmentasyonu daha stabil bir rengin oluşmasını sağlar (13, 15).

Ankara ve Denizli yöresi Kalecik Karası şaraplarının renk özelliklerini belirlemek için L*, a* ve b* değerleri ölçülmüş ve bu değerlerden Kroma (C)

ve Hue açısı değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3). Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarının renk özellikleri incelendiğinde şarapların L* değerleri 7.2- 20.6 arasında değişmiş ve ortalama L* değeri 13.1 bulunmuştur. Denizli yöresi Kalecik Karası şaraplarının L* değerleri 4.1 ile 11.2 arasında değişmiş ve ortalama 7.0 bulunmuştur. L* değerinin düşük olması rengin koyuluğunu gösterir (16). Örneklerde a* değerlerinin + yönde olması ve artması örneklerin kırmızılığının ve - yönde olması ve artması ise yeşil rengin artması anlamına gelmektedir (16). Örneklerde b* değerlerinin + yönde artması örneklerin sarılığının, - yönde artması ise maviliğinin artması anlamına gelmektedir (16). Bu renk değişikliklerini belirlemede L*, a*, b* değerlerinin tek başlarına değerlendirilmelerinin yeterli olmadığı bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar, hue açısı değeri ile duyusal analizde örneğin görünüşüne verilen puan arasında oldukça önemli bir korelasyon olduğunu ayrıca, Kroma (C) değerinin renk miktarını iyi bir şekilde yansıttığını ileri sürmüşlerdir (17). Bu nedenle Kalecik Karası şaraplarının Hue açısı ve Kroma değerleri üzerinde durulmuştur. Hue değeri rengin tonunu, Hue değerinin 0° olması kırmızı, 90° olması sarı, 180° olması yeşil ve 270° olması mavi rengi ifade etmektedir (18). Hue açısı (renk tonu) değerleri Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarında ortalama 21.17, Denizli yöresi şaraplarında ortalama 21.91 bulunmuştur. Hue açısı düştükçe kırmızı ton artar. Buradan Ankara yöresi şaraplarının renk tonu daha düşük olduğu için Ankara şaraplarında kırmızı rengin Denizli’ye göre daha baskın olduğunu söyleyebiliriz. Kroma değeri rengin doygunluğunu ifade eder. Mat renklerde Kroma değeri düşerken, parlak renklerde artmaktadır (19). Kroma (renk yoğunluğu) değerleri Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarında ortalama 33.48, Denizli yöresi şaraplarında ortalama 26.63 bulunmuştur. Ankara Kalecik Karası şaraplarının kroma değerleri daha yüksek yani daha parlaktır.

Kalecik Karası Şaraplarının Duyusal Özellikleri

Kalecik Karası şaraplarının duyusal özellikleri Tanımlayıcı Duyusal Analizler ile değerlendirilmiştir. Şaraplarda duyusal analizler 12 kişilik bir panelist grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (8, 9). Panelistler aroma ve lezzet profili analizlerinde şarapları 27 farklı kritere göre 15 puan üzerinden değerlendirmişlerdir. Kalecik Karası şaraplarının

duyusal özellikleri üzerine yörenin etkisi Şekil 1(A-B)'de verilmiştir. Renk kriteri bakımından Denizli yöresi şaraplarının puanları 5.1-14.2 arasında değişmiş, ortalama 10.9 bulunmuştur. Ankara yöresi şaraplarının renk puanları 5.8-12.5 arasında değişmiş, ortalama 10.2 bulunmuştur. Yörelere renk puanları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Kırmızı meyve kriteri bakımından Denizli yöresi şarapları ortalama 9.6 puan alırken, Ankara yöresi şarapları ortalama 10.3 puan almışlardır. Kırmızı meyve kriteri bakımından Ankara yöresi daha yüksek puanlar almış ve farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Şaraplarda kırmızı meyve kokuları genellikle yağ asitlerinin etil esterleri ve yüksek alkollerin asetatlarından ileri gelir. Denizli ve Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarında bu bileşiklerin miktarları incelendiğinde iki yöre arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmektedir. Şaraplarda bazı aroma bileşiklerinin yıla bağlı olarak taze meyve kokusunun baskılayıp, kuru meyve kokusunu artırdığı belirtilmiştir (20, 21). Malolaktik fermantasyon yan ürünlerinden aseton gibi bazı bileşiklerin taze ve kırmızı meyve kokularını baskıladıkları, bunun yanında marmelat kokusunu artırdıkları saptanmıştır (22). Denizli yöresi Kalecik Karası şaraplarında kırmızı meyve kriterinin daha düşük puanlar alması kuvvetli ihtimalle bu nedenden kaynaklanmış olabilir.

Siyah meyve kriteri bakımından Denizli yöresi şarapları ortalama 8.3 (burunda) ve 7.9 (ağızda) puan alırken, Ankara yöresi şarapları da aynı puanları almıştır. Siyah meyve kriteri bakımından Ankara yöresi ile Denizli yöresi arasında istatistiksel açıdan bir farklılık tespit edilmemiştir. Burunda Kuru meyve kriteri bakımından Denizli yöresi şarapları ortalama 8.7 puan alırken, Ankara yöresi şarapları ortalama 7.6 puan almışlardır. Burunda ve ağızda kuru meyve kriteri bakımından Denizli yöresi şarapları daha yüksek puanlar almış ve farklılık (burunda ve ağızda kuru meyve) istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Şaraplarda kuru meyve kokuları genellikle taze şaraplarda düşükken yıllanmaya bağlı olarak artış göstermektedir (21).

Diğer kriterlere bakıldığında Denizli yöresi şarapları marmelat, vanilya ve şekerimsi kriteri açısından, Ankara yöresi şarapları da baharat kriteri bakımından daha yüksek puanlar almışlardır.

Kalecik Karası şaraplarının duyusal özelliklerinin temel bileşen analizi sonuçları iki farklı diyagramda (Şekil 2A-B)'da verilmiştir. Şekil 2'e göre yöreye bağlı kısmi gruplanma gerçekleşmiştir. Temel bileşen analizine göre, PC1 bileşeni %45.2, PC2 bileşeni %14.2 ve PC3 bileşeni %11.3 oranında varyansı açıklamaktadır ve temel bileşen analizi toplamda 3 bileşen ile %70.7 oranında varyansı açıklamaktadır. Genç Kalecik Karası şaraplarının kırmızı meyve, siyah meyve, çiçek, renk, genel izlenim, gövde ve kompleks kriterleri ile korele iken, Yıllanmış şaraplar ise kuru meyve, vanilya, baharat, çikolata, marmelat gibi kriterler ile korelasyon göstermektedir.

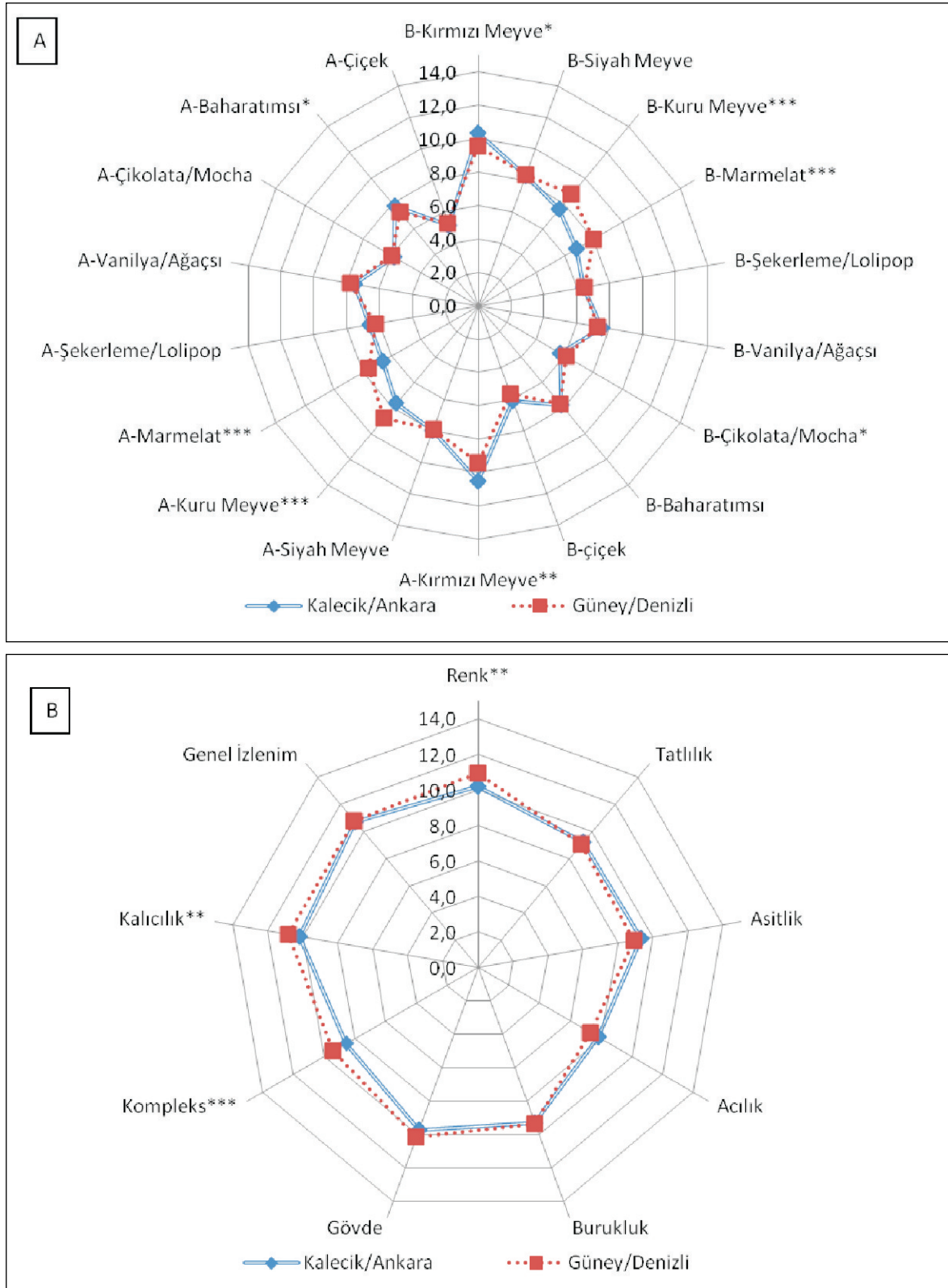
Tanımlayıcı duyusal analizler ve temel bileşen analizi sonucunda Kalecik Karası şaraplarının en baskın aroma tanımlayıcılarının kırmızı meyve, siyah meyve ve kuru meyve kokuları oldukları belirlenmiştir. Ankara yöresi şaraplarında kırmızı meyve, çiçek ve baharat kokularının Denizli yöresi şaraplarına göre daha baskın, Denizli yöresi şaraplarında ise kuru meyve ve marmelat kokularının daha baskın oldukları saptanmıştır. Panelistler kırmızı meyve tanımlayıcısına karşılık olarak vişne, çilek, kırmızı erik, ahududu meyvelerinin kokularını, siyah meyve tanımlayıcısına karşılık olarak ise bekaşı üzümü, böğürtlen, yaban mersini kokularını ve kuru meyve tanımlayıcı olarak da kuru erik, kuru üzüm ve kuru incir kokularını tanımlamışlardır.

SONUÇ

Bu çalışmada iki farklı coğrafi yörede üretilen farklı bağbozumu yıllarına ait Kalecik ve Güney kökenli kaliteli Kalecik Karası şaraplarının kimyasal bileşimleri ve duyusal tanımlayıcıları belirlenmiş ve yörenin etkisi saptanmaya çalışılmıştır.

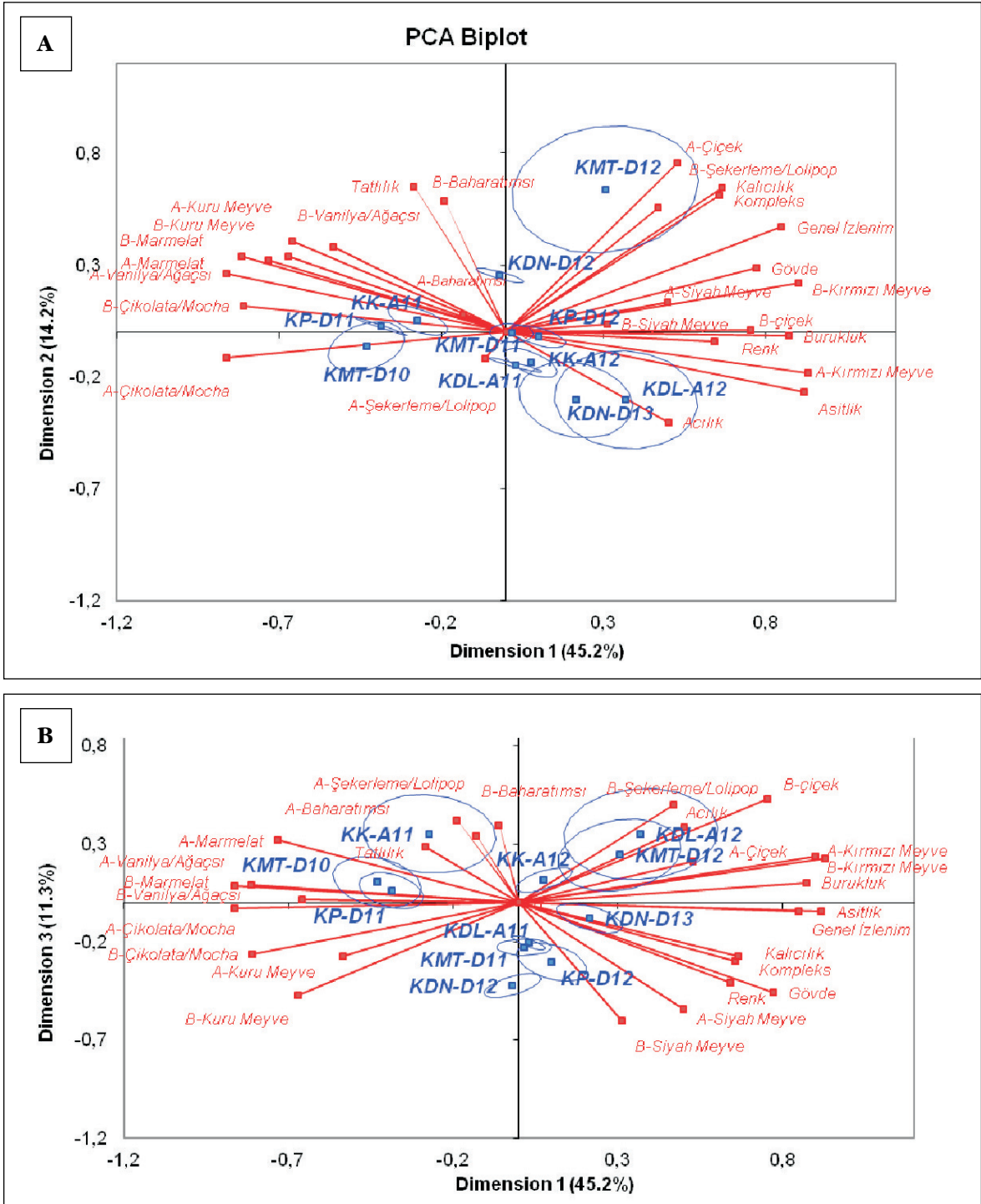
Kimyasal bileşim olarak; ortalama değerler üzerinden Ankara yöresi Kalecik Karası şaraplarının Denizli yöresi şaraplarına göre toplam fenolik bileşik (A: 1032.7mg/L, D: 1289.2 mg/L) miktarlarının daha düşük, toplam asit miktarlarının (A:5.1; D:4.7) ve antosiyanin (A: 109.8mg/L; D:91.1 mg/L) miktarlarının daha yüksek, renk özelliklerinin daha iyi oldukları, pH, uçar asit, alkol ve kurumadde miktarlarının ise çok benzer oldukları belirlenmiştir.

Tanımlayıcı duyusal analizler sonucunda en yüksek puanları alan aromatik tanımlayıcılar sırasıyla kırmızı meyve, siyah meyve, kuru meyve, baharat



Şekil 1 (A-B). Kalecik Karası şaraplarının duysal özellikleri üzerine yörenin etkisini gösteren örümcek ağı diyagramları * $P < 0.1$ ve ** $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ düzeyinde önemlidir.

Figure 1(A-B). Sensory Evaluation of Kalecik Karası Wines, Important at the * $P < 0.1$ ** $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ level.



Şekil 2 (A-B). Kalecik Karası şaraplarının aroma ve lezzet profillerinin temel bileşen analizi; A, PC1 ve PC2 bileşenleri grafiği; B, PC1 ve PC3 bileşenleri grafiği; A, Kalecik/Ankara yöresi örnekleri; D, Güney/Denizli yöresi örneklerini ifade etmektedir.
 Figure 2 (A-B). PCA of Taste and Aroma Profile of Kalecik Karası Wines

ve marmelat olmuştur. Ankara yöresi Kalecik Karası şarapları renk, kırmızı meyve bakımından; Denizli yöresi şarapları kuru meyve, marmelat bakımından daha yüksek puan almışlardır. Bazı panelistler, diğerlerine göre genç Kalecik Karası şaraplarında çiçek kokusunun belirgin olduğunu ifade etmişlerdir. Duyusal analiz verilerine uygulanan Temel Bileşen Analizi sonucunda genç Kalecik Karası şaraplarının kırmızı meyve, siyah meyve, çiçek, renk, genel izlenim, gövde ve kompleks kriterleri ile korele iken, Yıllanmış şaraplar ise kuru meyve, vanilya, baharat, çikolata, marmelat gibi kriterler ile korelasyon göstermektedir.

Elde edilen bulgular Avrupa Birliği Ülkelerinde kalite şaraplar için uygulanan ve ülkemizde de uygulanması gereken Kökeni Kontrollü İsimlendirme sistemine geçişte kalite Kalecik Karası şarabı için kaynak oluşturabilir. Kalecik Karası şarapları üzerinde benzer araştırmalar sürdürülmeli ve uzun yıllar verileri dikkate alınarak bulgular pekiştirilmelidir.

Teşekkür: Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi (ZF2014BAP2 nolu proje) tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, çalışmayı destekleyen Diren, Doluca, Kavaklıdere Mey Alkollü İçkiler ve Pamukkale Şarapları A.Ş.’ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. De La Presa-Owens C, Lamuela-Raventos M, Buxaderas S, Dela Torre-Boronat C, 1995. Characterization of Macabeo, Xarel and Parellada white wines from the Penedes region (II). *Am J Enol Vitic*, 46(4), 529-541.
2. Charters S, Pettigrew S, 2007. The dimensions of wine quality. *Food Qual Prefer*, 18, 997-1007.
3. Jover A J V, Montes F J L, Fuentes M D F, 2004. Measuring perceptions of quality in food products: The case of red wine. *Food Qual Prefer*, 15, 453-469.
4. San-Juan F, Ferreira V, Cacho J, Escudero A, 2011. Quality and aromatic sensory descriptors (Mainly Fresh and Dry Fruit Character) of Spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *J Agric Food Chem*, 59, 7916-7924.
5. Gil M, Cabellos J M, Arroyo T, Prodanov M, 2006. Characterization of the volatile fraction of young wines from the denomination of origin "Vinos de Madrid" Spain. *An Chim Acta*, 563, 145-153.
6. Anonim, 2015. Community methods for the analysis of wines, EEC No 2676/90. Office of Official Publications of the European Communities, 194 s.
7. Main G L, Morris J R, 1994. Color of Seyval blanc juice and wine as affected by juice fining during fermentation, *Am J Enol Vitic*, 45: 417-422.
8. Lawless H T, Heymann H, 2010. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices. Second Edition. Springer, 596s.
9. Altuğ T, Elmacı Y, 2011. Gıdalarda Duyusal Değerlendirme. İzmir: Meta Basım Bornova.
10. Meilgaard M C, Civille G V, Carr B T, 2007. Sensory Evaluation Techniques (4rd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
11. Kelebek H, Selli S, Canbaş A, 2011. Kalecik Karası üzümlerinden kırmızı şarap üretiminde soğuk maserasyon uygulamasının antosiyaninler üzerine etkisi. *Tar. Bil. Der.* 16, 287-294.
12. Kelebek H, Canbaş A, Cabaroğlu T, Erten H, Selli S, 2008. Öküzgözü, Boğazkere ve Kalecik Karası Üzümlerinin ve bu üzümlerden elde edilen şarapların genel bileşimi. I. Ulusal Bağcılık ve Şarap Sempozyumu ve Sergisi, 6-8 Kasım 2008, Denizli, s.145-159.
13. Ribéreau-Gayon P, Gloires Y, Maujean A, Dubourdieu D, 2006. Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments, John Wiley and Sons, Ltd., England.
14. Kelebek H, Canbaş A, Jourdes M, Teissedre P L, 2011. HPLC-DAD-MS determination of colored and colorless phenolic compounds in Kalecik karasi wines: Effect of different vineyard locations, *Anal Lett*, 44 (6), 991-1008s.
15. Keleek H, Canbaş A, 2005. Kırmızı Şaraplarda Antosiyaninlerin Kopigmentasyonu. *Dünya Gıda*, 3: 84-88.
16. Gould W A, 1977. Food Quality Assurance, The AVI Publisher, West-port, CT.

17. Wojdylo A, Figiel A, Oszmianski J, 2009. Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits, *J Agric Food Chem*, 57, 1337-1343.
18. Veberic R, Jurhar J, Peculic-Petkovsek M, Stampar F, Schmitzer V, 2010. Comparative study of primary and secondary metabolites in 11 cultivars of persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.), *Food Chem*, 119 (2), 477-483.
19. McGuire R G, 1992. Reporting of objective color measurement, *HortScience*, 27 (12), 1254-1255.
20. Camara J S, Alves M A, Margues J C, 2006. Multivariate analysis for the classification and differentiation of Madeira wines according to main grape varieties. *Talanta*, 68, 1512-1521.
21. Reboredo-Rodriguez P, Gonzalez-Barrreiro C, Rial-Otero R, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J, 2015. Effects of sugar concentration Processes in grapes and wine aging on aroma compounds of sweet wines. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55: 1053-1073.
22. Lytra G, Tempere S, Revel G, Barbe J C, 2012. Impact of perceptive interaction on red wine fruity aroma. *J Agric Food Chem*, 60 (50), 12260-12269.

BORNOVA MİSKETİ ŞARAPLARININ DUYUSAL TANIMLAYICILARININ BELİRLENMESİ

Merve Darıcı¹, Selin Yabacı Karaoğlu²,
Zeynep Dilan Çelik¹, Turgut Cabaroğlu^{1*}

¹Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Böl., Adana

²Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Müh. ve Doğa Bil. Fakültesi, Gıda Müh. Böl., Adana

Geliş tarihi / Received: 24.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 29.06.2016

Özet

Bu çalışmada piyasada bulunan farklı firmalar tarafından üretilmiş Ege Bölgesi orijinli Bornova Misketi şaraplarının, genel bileşimleri ve duyuşal tanımlayıcıları belirlenmiştir. Şarapların duyuşal analizlerinde Tanımlayıcı Duyuşal Analiz yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen duyuşal analiz verilerine Temel Bileşen Analizi (PCA) uygulanmıştır. Bornova Misketi Şaraplarının alkol oranları hacmen %11.0 ile %14.4 arasında, toplam asit miktarları 6.1 g/L ile 7.8 g/L arasında değişmiştir. Tüm şaraplar uçar asit ve kükürt dioksit miktarları bakımından Türk Gıda Kodeksine uygun bulunmuştur. Bornova Misketi şaraplarına uygulanan Lezzet-Aroma Profil Analizi sonuçlarına göre renk bakımından şaraplar benzer bulunmuş, renk skalasında açık sarı-saman sarısı olarak değerlendirilmiştir. Temel Bileşen Analizi sonuçlarına göre Bornova Misketi şarapları duyuşal açıdan, bir örnek hariç birbirine yakın bir şekilde gruplanmıştır. Şaraplar lavanta-ıhlamur, tropik meyve, narenciye, çiçek ve ağaç meyveleri kokuları ile pozitif korelasyon gösterirken ekşilik ve acılık kriterleri ile ters korelasyon göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Bornova Misketi, şarap, tanımlayıcı duyuşal analiz, PCA

SENSORY PROPERTIES OF BORNOVA MUSCAT WINES

Abstract

In this study, Sensory descriptor and general composition of Bornova Muscat wine that produced in Aegean Region of Turkey are obtained from marketplace were investigated. Sensory evaluation was carried out by Descriptive Sensory Analysis (DA) method. Principal Component Analyses (PCA) was used to evaluate the sensory data. Alcohol and total acid contents of Bornova Muscat wines varied between %11.0-%14 v/v and 6.1-7.8 g/L, respectively. Volatile acid and sulphur dioxide levels of all wines were in compliance with Turkish Food Codex. According to the Flavor and Aroma Profile Analysis, Bornova Muscat wines were found to be similar in terms of color attribute and were described as yellow-green silver glow to pale gold. The results of Principal Component Analysis showed that all wines except one sample were similar with respect to sensory evaluation. The wines were positively correlated to lavender-linden, tropical fruits, citrus, floral and tree fruits and negatively correlated to bitterness and sourness.

Keywords: Muscat of Bornova, wine, descriptive sensory analysis, PCA.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ tcabar@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 61 73/2172,

☎ (+90) 322 338 6614

GİRİŞ

Misket üzümüleri üzüm çeşitleri içerisinde özel ve yoğun aromaları ile Avrupa ve diğer şarap üreten ülkelerin şarap kültüründe önemli yer tutmaktadır. Misket üzüm çeşitleri farklı ülkelerde geniş yayılma alanı bulmuş, aromatik şaraplar veren bir ailedir (örn. İskenderiye misketi, Hamburg misketi, Ottonel misketi). Başta Fransa olmak üzere dünyanın şarap üreten ülkelerinde farklı misket üzümünden çoğunlukla doğal tatlı ve aromatik beyaz şaraplar üretilmektedir (1, 2). Bu şaraplar, elde edildikleri üzümün karakterini (çeşit aroması) ve bölgenin etkisini ciddi biçimde yansıtır. Bu bağlamda ülkemizin önemli bir aromatik üzüm çeşidi olan Bornova Misketi dikkat çekmektedir. Bu üzüm çeşidi ülkemizin tek yerli şaraplık misket çeşididir ve yalnızca Ege bölgesinde yetişmektedir. Bazı kaynaklarca ülkemizin en iyi aromatik beyaz şaraplık üzümü olarak nitelendirilmektedir (3-5). Şarapları dengeli tipik çiçeksi ve meyvemsi misket kokusundadır.

Türkiye'de Bornova kökenli olduğu kabul edilen Bornova misketi, bir *Vitis vinifera* L. çeşidi olup, Ege bölgesinde İzmir ve Manisa civarında yetiştirilir (6). Taneleri küçük ve yuvarlaktır, düşük asitli olan Bornova misketi, Ağustos ayında olgunlaşır, oldukça hoş bir aroma ve kokuya sahiptir (6,7). Ülkemize ait bu özel çeşit hakkında yapılmış çalışmalar sınırlı olup, Türkiye'de misket üzerine ilk çalışmalar Akman ve Gökçe (8) ve Akman (9) tarafından yapılmıştır. Akman ve Gökçe (8) "Tatlı misket şarapları (Mistel) üzerine bir araştırma" adlı çalışmalarında, misket üzümünden elde edilen mistelleri incelemiş ve bunların kalite yönünden çok iyi şarap verdiğini organoleptik testler ve fizikokimyasal analizlerle ortaya koymuşlardır. Aktan (10) "Ege Bölgesi şarapçılığı ve şarapları üzerine araştırmalar" konulu çalışmada bölgede üretilen şaraplardan misket şarapları ile mistellerini

incelemiş ve bu şarapların kimyasal analizlerini yapmıştır. Aktan (11) "Misket sırası, şarabı ve mistellerin aroma maddeleri üzerine konvansiyonel ve gaz kromatografisi metodu ile yapılan araştırmalar" adlı çalışmada bölgede üretilen misket üzümü ve bu üzümünden elde edilen şarap ve mistellerin aroma bileşikleri dönemin imkanları dahilinde incelenmiştir. Ardından Cabaroğlu ve ark. (12) "Bornova Misketi Şarabının Aroma Maddeleri Üzerine Bir Araştırma" adlı çalışmalarını yayınlamışlar, bunu takiben Selli ve ark., (4, 5, 13) bu üzüm sırası ve şarabının üzerine kabuk maserasyonunun etkisini incelemişlerdir.

Bu çalışmada Ege Bölgesi'nde Bornova Misketi üzümünden farklı firmalarca üretilen ve piyasada satılan Bornova Misketi şarapları kullanılmıştır. Ülkemizde üretilen ticari Bornova misketi şaraplarının duyuşal özellikleri üzerine kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı ülkemizde çeşitli firmalar tarafından üretilen Bornova Misketi şaraplarının genel bileşimini ve duyuşal tanımlayıcılarını Temel Bileşen Analizi (PCA) ile belirlemektir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada Türkiye'de Ege bölgesi olarak belirtilen coğrafi bölgeden 2013 yılında üretilmiş Bornova Misketi şarapları kullanılmıştır. Piyasadan beş firmaya ait 6 farklı marka Bornova Misketi şarap örnekleri 3 tekerrürlü olarak alınmıştır. Çalışmada kullanılan şaraplar kodlanarak Çizelge 1'de verilmiştir.

Şaraplarda Yapılan Genel Analizler

Şaraplarda alkol, toplam asitlik, pH, uçar asit, indirgen şeker, serbest ve toplam SO₂ analizleri (14, 15) yapılmıştır.

Çizelge 1. Bornova Misket Şarapları ve Kodları

Table 1. Wine Samples and Codes of Bornova Muscat Wines

Kod Code	Yıl Year	Firma Kodu* Firms Code	Yöre Province
M1	2013	A	Ege Bölgesi
M2	2013	B	Ege Bölgesi
M3	2013	C	Ege Bölgesi
M4	2013	D	Ege Bölgesi
M5	2013	E1	Ege Bölgesi
M6	2013	E2	Ege Bölgesi

*aynı sütunda yer alan her harf farklı bir firmayı temsil etmektedir.

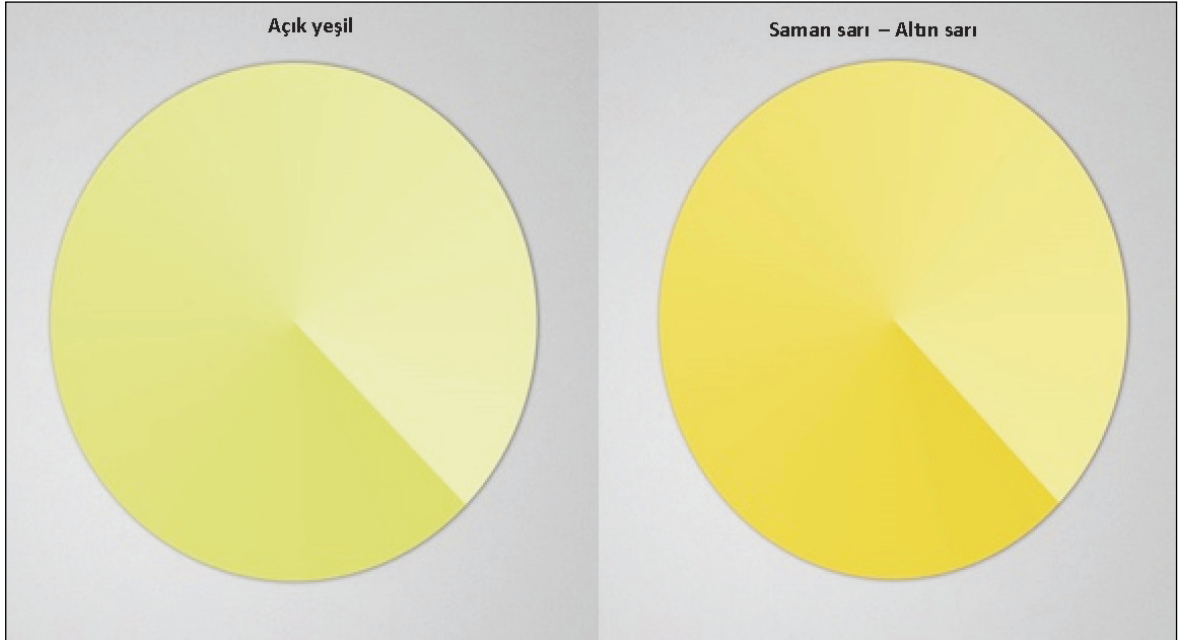
* different letters in the same column indicate different firms.

Tanımlayıcı Duyusal Analizler (DA)

Şarapların duysal profillerini belirleyebilmek için aroma ve lezzet profil analizleri uygulanmıştır (16,17). Analizler yaşları 23-55 arasında değişen 12 kişilik eğitilmiş ve deneyimli panelistler tarafından gerçekleştirilmiştir. Aroma Profil Analizi için; Panelistlere 2 saat süren 8 farklı oturum uygulanmış, ilk oturumda, panelistlerin aroma terimlerini tanıması sağlanmıştır. Bu oturumlar kapsamında panelistlere her bir duysal terime örnek verilebilecek standartlar sunularak bu aroma bileşiklerini tanımaları sağlanmıştır. İkinci oturumda ise panelistlerin beyaz şaraplar için genel olarak kullanılan (tatlılık, ekşilik, acılık, dolgunluk, kalıcılık) lezzet terimlerine karşı duyarlılıkları belirlenmiştir. Üçüncü çalışma oturumunda, panelistlere, farklı konsantrasyonlarda

aroma standartları sunulmuş ve panelistler tarafından tartışılarak en yüksek ve en düşük referans değerler belirlenmiştir. Dördüncü oturumda ise panelistlere, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış lezzet terimlerini temsil eden standart çözeltiler sunulmuş ve panelistlerden konsantrasyonlarına göre sıralamaları istenmiştir ve böylece en yüksek ve en düşük konsantrasyon referansları belirlenmiştir. Beşinci oturumda panelistlere beyaz şarapların görsel değerlendirilmesinde kullanılan referans renk skalası (Şekil 1) tanıtılmış ve bu skala ile ön denemeler gerçekleştirilmiştir.

Altıncı oturumda ise panelistler Bornova Misketi şarapları için kullanılacak tanımlayıcı terimleri ve standartları (Çizelge 2) belirlemişlerdir.



Şekil 1. Görsel değerlendirmede referans alınan renk skalası
Figure 1. References Color scale for visual evaluation

Çizelge 2. Duyusal Tanımlama Analizi İçin Seçilen Koku Tanımlayıcıları ve İlgili Referans Standartların Kompozisyonu
Table 2. Odor Descriptors and Related References Standards in Descriptive Sensory Analysis

Tanımlayıcılar Descriptors	Referans Standartlar ^a Reference Standards
Çiçeğimsi <i>Flowery</i>	1 µl sitronelol ve 2-fenil etil alkol standardı
Lavanta <i>Lavender</i>	1 µl linalol standardı
İhlamur <i>Linden</i>	2 gr kurutulmuş ihlamur çiçeği
Ağaç Meyveleri <i>Tree Fruit</i>	2 gr elma ve şeftali parçaları
Tropik Meyveler <i>Tropical fruit</i>	2 gr doğranmış karışık tropik meyve konservesi (ananas, mango, papaya) ve 1ml konserve suyu
Narenciye <i>Citrus Fruits</i>	1 µl jeraniol ve jeranik asit standardı
Bal <i>Honey</i>	1 gr bal

^a Miktarlar spesifik olarak 30 ml nötr genç beyaz şaraba ilave edilmiştir.

^a Addition of 30 mL neutral young white wine

Bu oturum sonunda son oturumlarda kullanılacak terimler kesinleştirilmiştir. Son olarak yedinci ve sekizinci oturumlarda, panelistler her bir tanımlayıcı için şarapları 15 puanlık skala kullanarak değerlendirmişlerdir (10). Her iki oturumda, şaraplar (20 ml ve 20 °C) kodlanmış lale şeklindeki, TS 6258'e uygun şarap bardaklarında rastgele bir düzende servis edilmiştir (18).

İstatistiksel Analizler

Duyusal analiz verilerini incelemek amacıyla varyans analizi (ANOVA) uygulamış ve önemli bulunan farklılıklara Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. Ayrıca, duyuşal verilere Temel Bileşen Analizi (PCA) uygulanarak şarapların karakteristiğini gösteren duyuşal tanımlayıcılar belirlenmiştir (16). Bu amaçla XLSTAT istatistik analiz programı kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bornova Misketi Şaraplarının Kimyasal Bileşimi

Bornova Misketi şaraplarının genel bileşimleri Çizelge 3'de verilmiştir.

Şarapların alkol oranları hacmen %11.0 ile %14.4 arasında değişmiştir. Alkolün şaraptaki miktarı olgun üzümün şeker konsantrasyonuna bağlıdır (19). Türk Gıda Kodeksi şarap Tebliği'ne göre şaraplarda hacmen alkol miktarı % 9-15 arasında değişir (20).

Organik asitler şarabın meyvemsi lezzetini ve tazelik hissini destekler ve şarabı korur (21). Yüksek asitliğe sahip genç beyaz şaraplar daha iyi yıllanma potansiyeli gösterir (22, 23). Şaraplarda organik asit miktarları 3-14 g/L arasında değişir. Bu değer, Türkiye'de ortalama 5g/L düzeyindedir

(24). Analizi yapılan Bornova misketi şaraplarının toplam asit miktarları 6.1 g/L ile 7.8 g/L arasında değişmiştir. Asitlik ile ilişkili diğer bir unsur olan pH Bornova Misketi şaraplarında 3.0 ile 3.5 arasında değişmiştir.

Şarapların indirgen şeker miktarları 2.7 g/L ile 34.2 g/L arasında değişmiştir. Bu değerlere göre şaraplar farklı tatlılık seviyelerindedirler. Türk Gıda Kodeksi Şarap Tebliği (2008/67)'e göre M4-M5-M6 kodlu şaraplar "Sek", diğer üç Misket şarabı ise "Dömisek" sınıfına girmiştir (20).

Uçar asitler alkol fermantasyonu sonucu oluşurlar ve en önemlileri asetik asittir. Oluşan uçar asit miktarı, şıranın bileşimine, maya suşuna ve fermantasyon koşullarına bağlıdır (15). Bornova Misketi şaraplarının uçar asit miktarları 0.2-0.4 g/L arasında değişiklik göstermiştir. Türk Gıda Kodeksi Şarap Tebliği'ne göre uçar asit miktarlarının asetik asit cinsinden beyaz şaraplar için 18 meq/L'den (1,08 g/L) fazla olamayacağı belirtilmiştir. Şarapların uçar asit miktarları TGK Şarap Tebliği'ne uygun olup limitin oldukça altındadır (20).

Şarabın üretilmesinde, olgunlaştırılmasında, şarap hastalık ve kusurlarının önlenmesinde kükürt dioksit önemli bir rol oynar. Kükürt dioksitin şarapta mikroorganizmalar üzerine antiseptik etkisi vardır ve oksijeni bağlayarak oksidasyonu önler (25). Bornova Misketi şaraplarının toplam kükürt dioksit miktarları 61-160 mg/L arasında değişmiştir. Türk Gıda Kodeksi Katkı Maddeleri Yönetmeliği'nde (20) sek beyaz şaraplar için izin verilen en yüksek toplam kükürt dioksit miktarı 200 mg/L iken, 5 g/L'den daha yüksek şeker içeren beyaz şaraplar için 250 mg/L'dir. Görüldüğü gibi tüm Bornova Misketi şaraplarının toplam kükürt dioksit miktarları bu limitlerin altında bulunmuştur.

Çizelge 3. Bornova Misketi Şaraplarının Genel Bileşimi
Table 3. Composition of Bornova Muskat Wines

Örnekler Samples	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Alkol (%h/h) Alcohol (v/v%)	12.9 ^a	12.2	11.0	13.0	13.8	14.4
Toplam asitlik (g/L)* Total Acidity	6.2	6.3	7.8	6.2	6.1	7.7
pH pH	3.0	3.5	3.0	3.4	3.4	3.2
Uçar asit (g/L)** Volatile Acidity	0.2	0.4	0.4	0.2	0.3	0.3
Serbest SO ₂ (mg/L) Free SO ₂	30.0	21.5	28.0	16.5	20.0	28.5
Toplam SO ₂ (mg/L) Total SO ₂	131.0	99.0	160.0	77.0	77.0	61.0
İndirgen şeker (g/L) Residual Sugar	34.2	24.4	30.4	4.8	2.7	3.2

*Tartarik asit cinsinden, **Asetik asit cinsinden, ^a Verilerde standart sapma %10'nun altındadır.

^aIn terms of tartaric acid, ^{**}In terms of acetic acid; ^a standart deviation is under %10 for all data

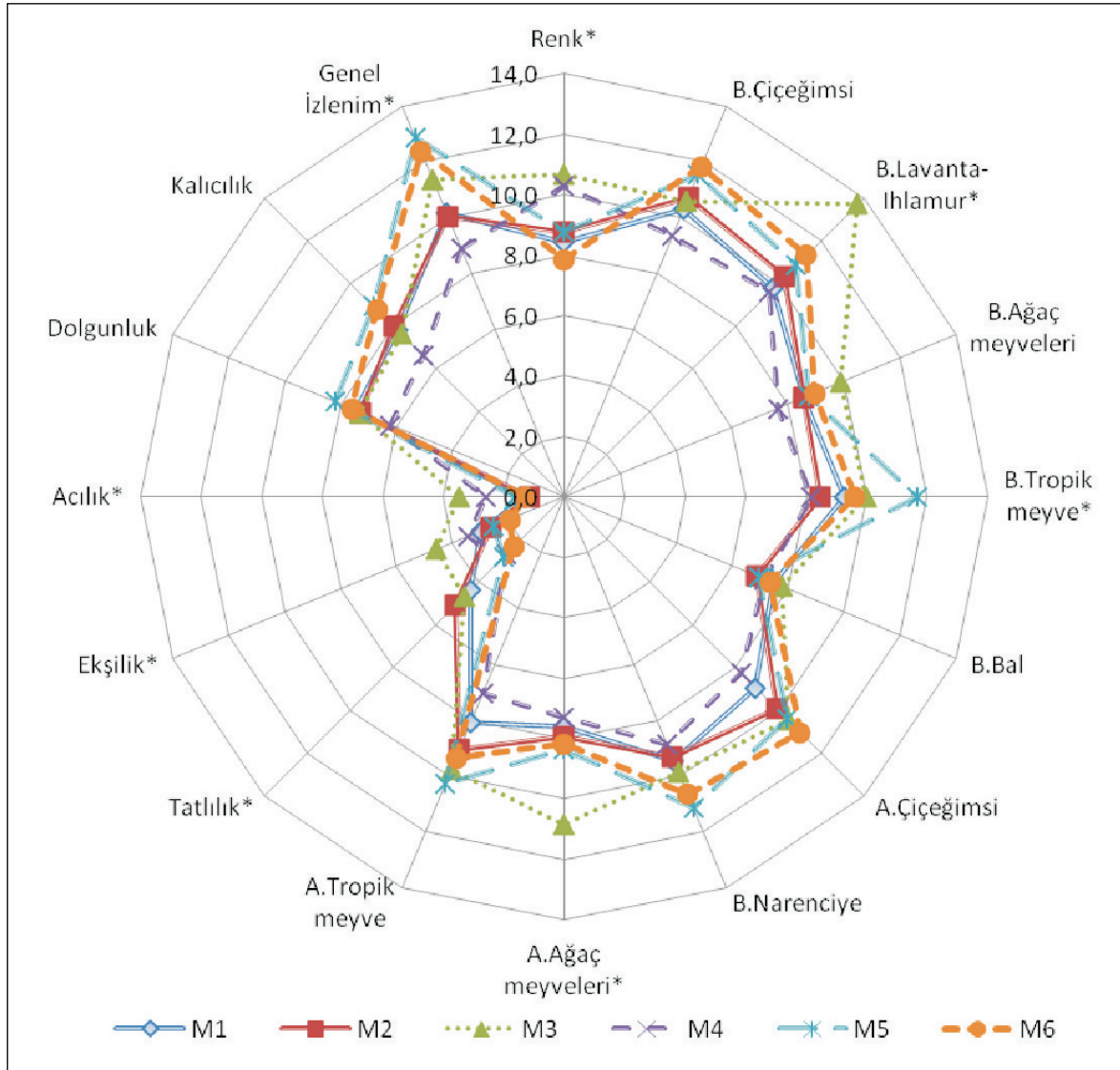
Bornova Misketi Şaraplarının Duyusal Tanımlayıcıları

Bornova Misketi şaraplarının duysal özellikleri Aroma ve Lezzet Profil Analizi ile değerlendirilmiştir. Şaraplarda duysal değerlendirme 12 kişilik bir panelist grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (16, 17). Panelistler, şarapları 16 farklı kritere göre 15 puan üzerinden değerlendirmişlerdir. Değerlendirme sonuçları, örümcek ağı diyagramı ile Şekil 2'de ve istatistiksel değerlendirme sonuçları ise Çizelge 4'de verilmiştir.

Renk kriteri bakımından M6 örneği en düşük puanı almıştır ve bunu M1, M5 ve M2 takip etmektedir.

Renk skalasına (Şekil 1) göre daha düşük puan almış olan örnekler beyaz şaraplarda istenen yeşil-açık sarı tonlarına sahiptirler. Bunun yanında M3 ve M4 şarapları da saman sarısı olarak değerlendirilmiştir. Anova testine göre renk kriterinde fark önemli bulunmuş olsa da Duncan çoklu karşılaştırma testine göre renk kriteri bakımından örnekler birbirine benzer bulunmuştur.

Lavanta-ıhlamur kriteri bakımından en yüksek puanı M3 örneği almıştır. Diğer örnekler bu değeri takip ederek 9.6 ile 11.3 arasında değerler almış ve Bornova misket şaraplarının en önemli koku tanımlayıcısı olmuştur. Bunun yanında burunda



Şekil 2. Bornova Misketi şaraplarının Lezzet ve Aroma Profil Analizi sonuçlarına dair örümcek ağı diyagramı (B: burunda, A: ağızda). * P < 0.05 düzeyinde önemlidir.

Figure 2. Sensory Evaluation of Bornova Muscat Wines (B: nose, A: plate), *Important at the P < 0.05 level.

Çizelge 4. Bornova Misketi Şaraplarının Duyusal Analiz Sonuçları
Table 4. Results of Sensory Evaluation of Bornova Muscat Wines

Tanımlayıcılar Descriptors	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Renk* Color	8.4 ^c	8.8 ^c	10.7 ^a	10.3 ^{ab}	8.7b ^c	7.9 ^c
B.Çiçeğimsi Flowery	10.3	10.7	10.6	9.4	11.5	11.8
B.Lavanta-ıhlamur* Lavender-linden	9.8 ^b	10.3 ^b	13.7 ^a	9.6 ^b	10.8 ^b	11.3 ^{ab}
B. Ağaç meyveleri Tree fruits	8.6	8.6	9.9	7.6	8.7	9.0
B. Tropik meyve* Tropical fruits	9.3 ^b	8.5 ^b	10.0 ^{ab}	8.2 ^b	11.7 ^a	9.6 ^{ab}
B.Bal Honey	7.5	6.9	7.8	7.2	7.0	7.4
B. Narenciye Citrus fruits	9.4	9.3	9.8	8.9	11.1	10.7
A.Çiçeğimsi Flowery	8.9	9.9	10.5	8.3	10.4	11.0
A. Ağaç meyveleri* Tree fruits	7.6 ^b	7.9 ^b	10.8 ^a	7.3 ^b	8.3 ^b	8.2 ^b
A. Tropik meyve Tropical fruits	8.1	9.1	9.8	7.0	10.3	9.3
Tatlılık* Sweetness	4.4 ^{ab}	5.1 ^a	4.7 ^a	2.7 ^c	2.8 ^{bc}	2.4 ^c
Eksşilik* Sourness	3.0 ^b	2.6 ^b	4.6 ^a	3.4 ^{ab}	2.5 ^b	2.0 ^b
Acılık* Bitterness	1.3 ^c	1.2 ^c	3.5 ^a	2.6 ^{ab}	1.6 ^{bc}	1.3 ^{bc}
Dolgunluk Body	7.5	7.3	7.3	6.2	8.2	7.6
Kalıcılık Persistence	7.8	8.0	7.6	6.6	8.9	8.8
Genel izlenim* Harmony	10.2 ^{acd}	10.0 ^{cd}	11.3 ^{abc}	8.9 ^d	12.9 ^a	12.4 ^{ab}

F: varyans analizine göre farklılık durumu, A: Ağızda B: Burunda, * $P < 0.05$ düzeyinde önemlidir, **aynı satırda değişik harflerle gösterilen değerler arasındaki fark Duncan çok karşılaştırma testine göre önemlidir ($P < 0,05$).

F; significance at which means differ as shown by analysis of variance; A:plate; B:nose, *Important at the $P < 0.05$ level ** a - d Different superscripts in the same row indicate statistical differences at the $P < 0.05$ level.

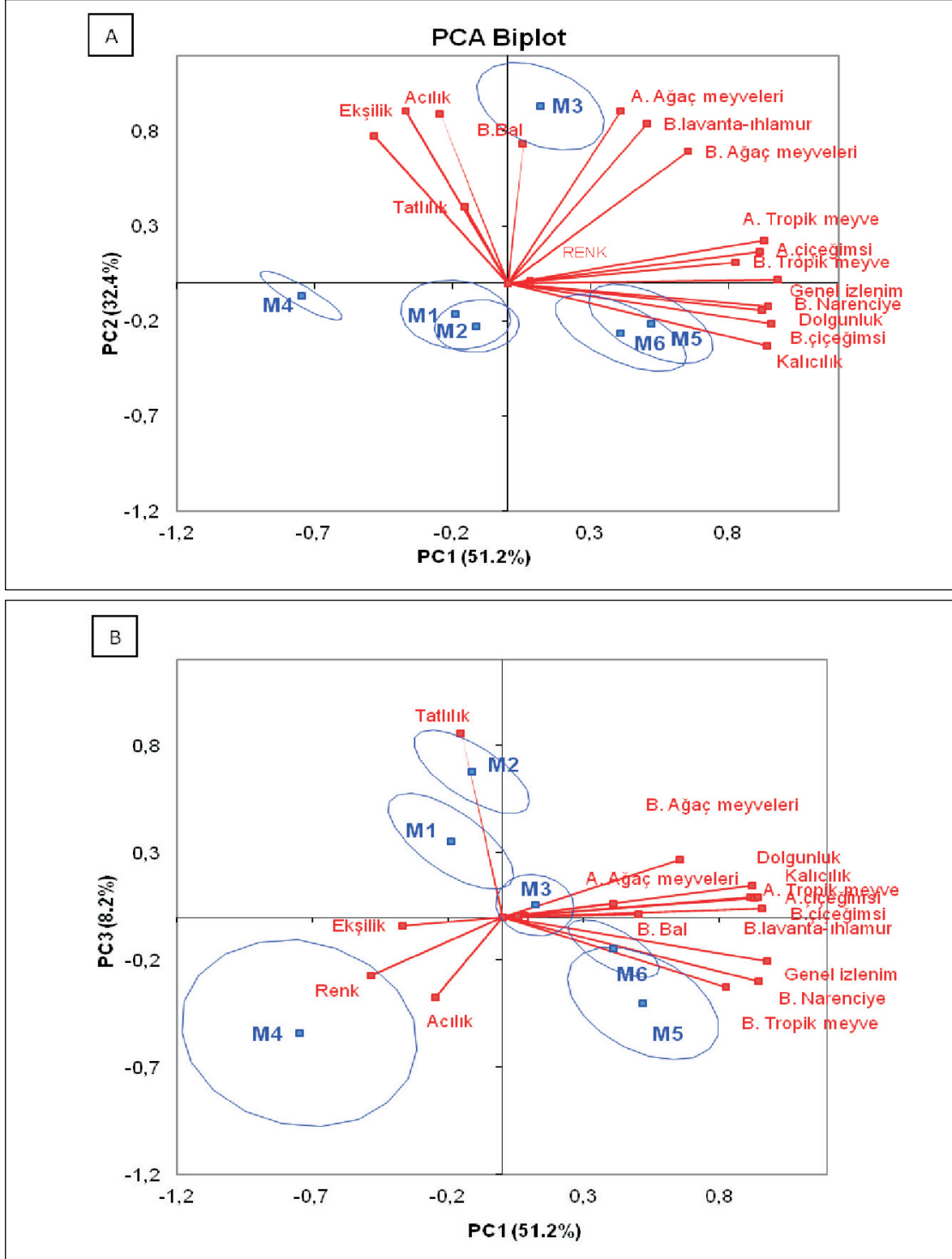
tropik meyve kriteri bakımından en yüksek puanı M5 örneği almış ve bunu diğer örnekler 10 ile 8.2 arasında puanlar alarak takip etmiştir. Tropik meyve (burunda) kriterinde Duncan testine göre sadece M5 örneği diğerlerinden farklı olarak belirlenmiştir. Diğer örnekler arasındaki fark önemsizdir. Ağızda ağaç meyveleri kriteri bakımından en yüksek puanı M5 örneği almıştır. Bu kriter bakımından M5 kodlu örnek ile diğer örnekler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Çiçeksi, Narenciye, Tropik meyve (ağızda), ağaç meyveleri (burunda) gibi diğer koku tanımlayıcıları yönünden şarap örnekleri arasında önemli bir fark belirlenmemiştir.

Tatlılık bakımından örnekler arasındaki fark önemli bulunmuştur. Sek şarap örnekleri daha düşük puanlar alarak dömisek şarap örneklerinden ayrılmıştır. Genel izlenim bakımından en yüksek puanı 12.9 ile M5 örneği almıştır ve bunu 12.4 puan ile M6 ve 11.3 ile M3 örneği takip etmiştir.

Bornova Misketi şaraplarının duyusal özelliklerinin temel bileşen analizi sonuçları iki farklı diyagramda (Şekil 3A-B) verilmiştir. Temel Bileşen Analizi'ne göre, PC1 bileşeni %51.2, PC2 bileşeni %32.4 ve PC3 bileşeni %8.2 oranında varyansı açıklamaktadır ve temel bileşen analizi toplamda 3 bileşen ile %91.8 oranında varyansı açıklamaktadır.

Şekil 3A'da görülen Temel Bileşen Analizi sonuçlarına göre sadece iki bileşen (PC1 ve PC2) ile açıklanan duyusal tanımlayıcılardan, tatlılık ve renk kriterleri bu iki bileşen ile yeterli bir şekilde açıklanamamıştır. Bu nedenle üçüncü (PC3= %8.2) bileşen de Temel Bileşen Analiz sonuçlarına dahil edilmiştir ve Şekil 3B'de oluşturulmuştur. Böylece renk ve tatlılık kriterleri daha anlamlı bir şekilde açıklanmıştır. Şekil 3B'de görüldüğü gibi Tatlılık kriteri M1 ve M2 örnekleri ile pozitif bir korelasyon göstermiştir. Bu sonuç dömisek olarak belirtilen M1 ve M2 örnekleri için beklediğimiz bir sonuçtur.

Şekil 3A'ya göre şarap örnekleri %95 güven aralığında 4 grup oluşturmuşlardır. Bir grupta M1 ve M2; diğer grupta M5 ve M6 yer alırken M4 ve M3 tek başlarına bir grup oluşturmuştur. Verileri daha iyi inceleyebilmek için Şekil 3B'ye de bakıldığında M3 örneğinin %95 güven aralığında M1 örneğinden farklı olmadığı görülmektedir. Şekil 3(A-B)'ye birlikte bakıldığında Bornova Misketi şarapları duyusal özellikleri bakımından birbirine yakın bir şekilde gruplanmıştır, bunlardan sadece M4 örneği gruptan ayrılmıştır. Bornova Misketi şarapları lavanta-ıhlamur, tropik meyve, narenciye, çiçek ve ağaç meyveleri kriterleri ile korelasyon gösterirken, eksşilik ve acılık kriterleri ile ters korelasyon göstermişlerdir.



Şekil 3(A-B). Bornova Misketi şaraplarının duyusal özelliklerinin Temel Bileşen Analizi
Figure 3 (A-B). PCA of Taste and Aroma Profile of Bornova Muscat Wines

SONUÇ

Bu çalışmada Ülkemizin en aromatik beyaz şarabı olan Bornova Misketi şarabının kimyasal bileşimleri ve duyuşsal tanımlayıcıları araştırılmıştır. Duyuşsal analizler 12 kişilik bir panelist grubu tarafından yapılmış ve analizlerde Aroma ve Lezzet Profil Analizi yöntemleri uygulanmıştır. Duyuşsal analiz verileri Temel Bileşen Analiziyle değerlendirilmiş ve sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

Bornova Misketi Şaraplarının alkol oranları hacmen %11.0 ile %14.4 arasında, toplam asit miktarları 6.1 g/L ile 7.8 g/L arasında değişmiştir. Genel bileşim açısından şaraplar Türk Gıda Kodeksinde belirtilen kriterlere (uçar asit, kükürt dioksit) uygun bileşimde bulunmuştur.

Renk açısından şaraplar açık sarı-saman sarısı olarak tanımlanmış ve Duncan testine göre renk kriteri bakımından şaraplar benzer bulunmuştur. Tatlılık bakımından sek şaraplar dömisek şaraplardan ayrılmıştır. Şaraplar acılık ve ekşilik bakımından oldukça düşük puanlar alırken kalıcılık bakımından yeterli puanlar almışlardır.

Tanımlayıcı Duyuşsal Analiz sonuçlarına göre Bornova Misket şarapları aromatik açıdan burunda çiçek (özellikle lavanta-İhlamur), narenciye ve tropik meyve kokuları ile öne çıkarken, ağızda bunların yanında ağaç meyveleri ile öne çıkmıştır. Temel Bileşen Analiz sonuçlarına göre bir örnek hariç duyuşsal özellikler açısından şaraplar benzer ve birbirine yakın bulunmuştur.

Elde edilen bulgular ülkemizde uygulanması gereken Kökeni Kontrollü İsimlendirme sistemine geçişte yararlı olabilir. Bu noktada uzun yıllar verileri elde edilebilmesi için Bornova Misketi şarapları üzerinde farklı yıllar için benzer çalışmalar sürdürülmelidir.

Teşekkür: Bu çalışma Çukurova Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi ZF2013BAP4 nolu proje tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı Çukurova Üniversite'sine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Günata Y Z, Bayonove C L, Baumes R L, Cordonnier R E, 1986. Stability of Free and Bound Fractions of Some Aroma Components of Grapes cv. Muscat During the Wine Processing: Preliminary Results. *Am J Enol Vitic*, 37(2), 112-114.

2. Schneider R, Razungles A, Augier C, Baumes R, 2001. Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis uinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscat wines. *J Chromatogr A*, 936, 145-152.

3. Selli S, Cabaroğlu T, Canbas A, 2001. Kalecik karası üzümünün şirasından elde edilen serbest aroma maddelerinin belirlenmesinde iki farklı ekstraksiyon metodunun karşılaştırılması, *Gıda*, 6, 443-448.

4. Selli S, Canbas A, Cabaroğlu T, Erten H, Günata Z, 2003a. Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin contact treatment, *Food Chem*, 94, 319-326.

5. Selli S, Cabaroğlu T, Canbas A, Erten H, Nurgel C, 2003b. Effect of the skin contact on the aroma composition of the musts of *Vitis vinifera* L. cv. Muscat of Bornova and Narince grown in Turkey, *Food Chem*, 81, 341-347.

6. Aktan N, 1976. Bornova misketinde olgunluğun şarap kalitesine etkisi üzerine bir araştırma, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 302, İzmir.

7. Çelik H, YS, 1998. Ağaoğlu Y, Fidan B. Marasalı, G. Söylemezoğlu, Genel Bağcılık, Sunfidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 1, Ankara.

8. Akman AV, Gökçe K, 1942. Tatlı misket (mistel) şarapları üzerinde bir araştırma, *Ziraat Dergisi*, 34, Ankara.

9. Akman AV, 1947. Türkiye Şarapçılığı, Yüksek Ziraat Enstitüsü Dergisi, cilt 8, 2, 16, Ankara.

10. Aktan N, 1963. Ege Bölgesi şarapçılığı ve şarapları üzerine araştırmalar. Doktora Tezi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, İzmir.

11. Aktan N, 1972. Misket şarası, şarabı ve mistellerin aroma maddeleri üzerinde konvansiyonel ve gaz kromatografisi metodu ile yapılan araştırmalar. Doçentlik tezi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda ve Fermantasyon Teknolojisi Kürsüsü. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 190.

12. Cabaroğlu T, Günata Z, Canbas A, 1997. Bornova Misketi Şarabının Aroma Maddeleri Üzerinde Bir Araştırma. *GIDA*, 22(2), 137-145.

13. Selli S, 2004. Kalecik Karası, Bornova Misketi ve Narince Üzümlerinin Aroma Maddeleri ve Bu Üzümlerden elde edilen şarapların Aroma Maddeleri Üzerine Kabuk Maserasyonu ve Glikozidaz Enziminin Etkileri. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

14. Anonim 2005. Community Methods for the Analysis of Wines, EEC No 2676/90. Office of Official Publications of the European Communities, 194 s.
15. Ough C S, Amerine M A, 1988. Methods for Analysis of Musts and Wines, John Willey and Sons, New York, 377s.
16. Lawless H T, Heymann H, 2010. Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices. Second Edition. Springer, 596s.
17. Altuğ T, Elmacı Y, 2011. Gıdalarda Duyusal Değerlendirme. İzmir: Meta Basım Bornova.
18. Anon, 1988; TS6258 Duyusal Analizlerin Şarap Tadım Bardakları, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
19. Ribéreau-Gayon P, Gloires Y, Maujean A, Dubourdieu D, 2006. Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments, John Wiley and Sons, Ltd., England.
20. Anon, 2009. Türk Gıda Kodeksi Şarap Tebliği, Resmi Gazete Sayı 27131, 4 Şubat 2009. Tebliğ No: 2008/67.
21. Styger G, Prior B, Bauer Florian FF, 2011. Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38:(9), 1145-1159.
22. Jackson D I and Lombard P B. 1993. Environmental and Management Practices Affecting Grape Composition and Wine Quality- A Review. *Am J Enol Vitic*, 44(4), 409-430.
23. Conde C, Silvia P, Fontes N, Dias APC, Tavares RM, Sousa MJ, Agasse A, Geros H. 2007. Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, 1, 1-22.
24. Aktan, N., Kalkan, H., 2000. Şarap Teknolojisi. Kavaklıdere Eğitim Yayınları, No:4, Ankara, 614s.
25. Cabaroğlu T, Canbaş A, 1993. Şarapçılıkta Kükürtdioksitin Kullanımı ve Önemi, *GIDA*, 18(2): 139-144.
26. Anon, 2013. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği, Resmi Gazete Sayı 28693 (3. Mükerrer), 30 Haziran 2013.

ÜZÜM ÇEKİRDEK YAĞI ELDESİNDE KULLANILAN EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

Onur Sevindik, Serkan Selli

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

Geliş tarihi / *Received*: 03.05.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 21.07.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 22.07.2016

Özet

Uzun yıllardır üzüm yetiştiriciliğinde önemli bir konumda bulunan ülkemizde, üzüm işleyen işletmelerin atığı olarak her yıl açığa çıkan tonlarca üzüm posasının değerlendirilmesi, ülke ekonomisi için her geçen gün önem kazanmaktadır. Bu anlamda üzüm çekirdek yağı, sahip olduğu zengin biyoaktif bileşikler nedeniyle gıda, farmasotik ve kozmetik sektörlerince oldukça popüler bir ürün haline gelmiştir. Üzüm çekirdeği yağının ekstraksiyonunda soğuk pres yöntemi hem bileşenlere zarar vermemesi, hem de maliyetinin düşük olması nedeniyle en yaygın kullanılan yöntem olmasına rağmen, günümüzde soğuk pres yönteminde verimin düşük olması, daha yüksek verimle ekstraksiyon gerçekleştirebilen (çözücü destekli, süper-kritik sıvı destekli, mikrodalga destekli, ultrases destekli, enzim destekli vb.) farklı yöntemlerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu derlemede üzüm çekirdeği yağı ekstraksiyonunda kullanılan önemli ekstraksiyon yöntemlerinin olumlu ve olumsuz özellikleri ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Üzüm çekirdeği, çekirdek yağı, yağ ekstraksiyon yöntemleri

THE EXTRACTION METHODS OF GRAPE SEED OIL

Abstract

Valorisation of grape marc, is a refuse of grape processing factories revealing each year in tons, is gaining an economic importance for the Turkey which has a significant position in viticulture for many years. In this manner, grape seed oil has become a popular product for food, pharmaceutical and cosmetic industries due to its rich bioactive components. Although, the cold press method is the most used one for the grape seed oil extraction as both being innocuous for oil constituents and having low cost; limited yield of this method lead to progress various methods (solvent assisted, supercritical liquid assisted, microwave assisted, ultrasound assisted, enzyme assisted etc.) which are able to carry out higher extraction yields so far. In this review, the advantages and disadvantages of important methods used for grape seed oil extraction were discussed in detail.

Keywords: Grape seed, seed oil, oil extraction methods.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ sselli@cu.edu.tr,

☎ (+90) 322 338 6173,

☎ (+90) 322 338 6614

GİRİŞ

Üzüm (*Vitis vinifera* L.), dünya üzerinde yaklaşık 7 milyon hektar alanda, 58 milyon tonluk üretim hacmiyle en yaygın yetiştiriciliği yapılan (1), yüksek besin içeriği ve önemli biyoaktif bileşenlere sahip olması nedeniyle de dünyada ve ülkemizde en çok tüketilen meyvelerden biridir. Dünyada toplam üretilen üzüm miktarının yaklaşık %80'i şarap yapımında kullanılmaktadır (2). Ülkemiz ise uygun ekolojik özelliklere sahip olması nedeniyle, bağcılık alanında dünyanın en önemli ülkelerinden birisidir (3). Yıllık yaklaşık 470,000 hektarlık bağ alanında, 4 milyon 6 yüz bin ton üzüm üretimi gerçekleşmektedir (4). Bu sayede hasat süresinin ilk birkaç haftası boyunca milyonlarca ton üzüm posası ortaya çıkmaktadır. Şarap ve üzüm suyu üretiminden geriye kalan bu posada önemli düzeyde biyoaktif bileşikler bulunmaktadır (5, 6). Üzüm çekirdekleri bu posanın kuru ağırlık bazında %38-52'lik önemli bir kısmını oluşturur (7). Son yıllara kadar birçok şaraphane üzüm posalarını geri dönüştürülebilir atık olarak değerlendirmeyenken, günümüzde besin değeri oldukça yüksek olan bu posaları üzüm çekirdeği yağı üreten fabrikalara veya yüksek antioksidan özelliğinden dolayı da kozmetik ve farmasötik üretim yapan sektörler için ham madde olarak satmaya başlamışlardır (8). Doğal antioksidanların önemli bir kaynağı olarak nitelendirilen gıda sanayisinin atık ürünlerine (çekirdekler, kabuklar, saplar, gövde ve yapraklar gibi) son yıllarda ilgi oldukça artmıştır (6, 9). Bunlar içerisinde üzüm çekirdeklerinin değerlendirilmesi ekonomik açıdan önemli bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (10). Üzüm çekirdekleri % 7-20 civarında yağ içermektedir, geri kalanını kuru bazda %40 fiber yapı, %7 tanenler gibi karmaşık yapıda bulunan fenolikler, %11 proteinler, %7'sini su ve iz miktarlarda şekerler ve mineraller oluşturmaktadır (5, 7, 11). Hafif meyvemsi lezzeti, genellikle meyvemsi ve turunçgil kokuları veren monoterenlere (limonen, mirsen, β -pinen vb.) sahip olması, yüksek dumanlanma sıcaklığı (216.7°C), iyi derecede sindirilebilir oluşu ve kızartma yağı olarak kullanıldığında viskozitesinde önemli derecede bir artış gerçekleşmemesi, yüksek kalitedeki bir üzüm çekirdeği yağını karakterize eden temel özelliklerdir (12, 13). Üzüm çekirdeklerinin sahip oldukları yağ verimi, biyoaktif bileşenleri ve aroma profilleri buldukları üzümün cinsine

göre de farklılıklar gösterebilmektedir (14, 15). Literatür sonuçlarından yola çıkarak, hasat dönemlerinde toplanan üzümlerin çekirdekleri farklı oranlarda yağ bulundurdukları ve yalnızca hasat döneminde değil üzümün farklı olgunlaşma evrelerinde de farklı miktarlarda yağ oranlarına sahip olduğu belirlenmiştir (16). Yağ miktarındaki değişim sadece olgunlaşmaya bağlı olmayıp, lipoksigenaz gibi enzimlerin aktiviteleri (17), nem miktarı (16), toprağın yapısı ve mevsimsel koşullar gibi faktörlere de bağlıdır. Çekirdeklerden elde edilecek yağın miktarı, ekstraksiyon yöntemine ve eğer kullanılıyorsa, çözücünün cinsine göre de ciddi oranda farklılıklar göstermektedir. İçerdikleri yağ miktarı, genellikle çözücü destekli ekstraksiyon (soxhlet, goldfish, vb.), çözücüsüz soğuk pres ekstraksiyonu (mekanik ram pres, mekanik öğütücü sistemler), enzim destekli sulu ekstraksiyon veya yağların fiziksel ve kimyasal yapısını temel alan enstrümental yöntemlerle (mikrodalga, ultrases, süperkritik sıvı, kızılötesi, X-ışını emilimi) belirlenir (18-20). Günümüzde ise elde edilecek yağın kullanım amacına göre farklı ekstraksiyon yöntemleri uygulanmaktadır. Bu derleme makalesinde üzüm çekirdeklerinden yağ ekstraksiyonunda kullanılan önemli ekstraksiyon yöntemleri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

ÇEKİRDEK YAĞI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

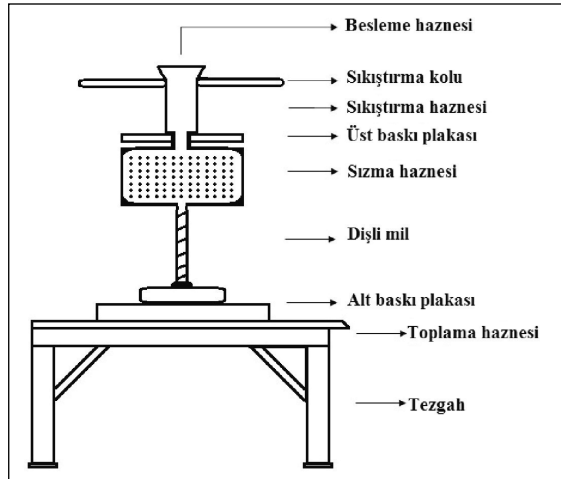
Soğuk pres yöntemi ile yağ ekstraksiyonu

Soğuk pres, herhangi ısı ve kimyasal işlem gerektirmeyen bir yöntemdir. Presleme, genellikle yağ eldesi sürecinin ilk aşaması olarak bildirilmiştir (21). Endüstride yağlı tohumlardan soğuk pres yöntemi ile yağ eldesi genellikle; ön temizleme, kurutma, öğütme ve presleme işlemlerinden oluşan dört aşamalı bir işlemler gerçekleştirilir (8). Rafine edilmiş yağlara göre, daha kaliteli ve besin değeri yüksek yağ elde edilmesinden dolayı, son yıllarda bu yöntem olan ilgi artmıştır. Kullanımı basit ve kolay olan bu yöntemin, oldukça az miktarda enerji gerektiriyor olması, çözgen kullanılmaması, diğer yöntemlerde olduğu kadar yüksek sıcaklıklara çıkılmaması, yağın en önemli kalite unsurlarından biri olan yüksek polifenol bileşiklerini koruyarak, bu bileşiklerin doğal antioksidatif özellikleri sayesinde yağda radikallerden kaynaklanan oksidatif bozulmalara engel olması soğuk pres yönteminin önemli avantajlarından (22). Öte yandan, soğuk presle

elde edilen yağ miktarının diğer yöntemlere kıyasla daha düşük olmasına rağmen (23, 24), bu yöntemde herhangi bir kimyasal çözücü kullanılmadığından ürünü kimyasal kontaminasyondan koruyarak tüketicinin arzusunu karşılayacak derecede güvenli hale getirmektedir (25). Bu yöntem bir diğer ekstraksiyon yöntemi olan sıcak presleme yöntemi ile kıyaslandığında yağ verimi düşük kalmakta fakat sıcak preslemede uygulanan ısı işleminden kaynaklanan istenmeyen renk, koku ve tat bileşikleri oluşmamaktadır. Soğuk presleme ile yağ çıkarma işlemi, mekanik ram presleme, hidrolik presleme veya dişli öğütücülerle presleme gibi çeşitli yöntemlerle yapılmaktadır.

Mekanik ram pres sistemi ile yağ ekstraksiyonu

Bir çeşit soğuk pres yöntemi olan bu sistem, kapalı bir kabinin içinde bulunan ve dönerik ilerleyen pistonun çekirdeklere uygulamış olduğu kuvvet sayesinde yağın ekstrakte edildiği bir işlemdir (Şekil 1). Literatürde bu yöntemle yapılan ekstraksiyon işleminin yağ veriminin mekanik dişli öğütücülerle yapılan presleme işlemine göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (26, 27).

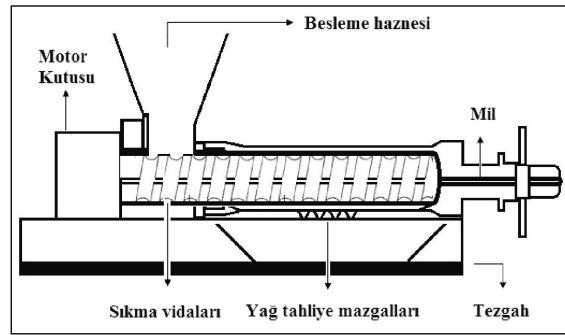


Şekil 1. Mekanik ram pres

Mekanik dişli öğütücüler ile yağ ekstraksiyonu

Mekanik dişli öğütücü sistemi, yağlı tohumlardan yağ ekstraksiyonunda dünya üzerinde tercih edilen en yaygın yöntemlerden biridir. Farklı zamanlarda hasat edilmiş üzümlerden bu yöntemle gerçekleştirilen yağ ekstraksiyonu sonucunda elde edilen verimin %13-15 civarında olduğu bildirilmiştir (11). Ekstraksiyon işlemlerinde maliyeti önemli bir şekilde arttıran çözümlerin

kullanılmadığı bu yöntemin diğer avantajları sistemin kolay kullanımı, dayanıklılığı, işlem süresinin kısalığı ve farklı tohumlarla da yağ üretimi yapılabilmesi olarak sıralanabilir (28). Ancak mekanik aksam genellikle tek öğütücüye sahip olup yağ veriminin dişli öğütücünün yaratmış olduğu sürtünme ve dönme gücüne doğrudan etki ettiği bu sistemlerde (Şekil 2), sürtünmeden ve verimsiz sıkıştırmadan kaynaklanan ikinci bir fraksiyon oluşumu, zaman zaman sistemin fazladan enerji tüketmesi ve ısınmasına dolayısıyla da yağda kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Özellikle, kabuklu çekirdeklerden yağ eldesinde bu sorunlarla daha sık karşılaşılırken, çözüm olarak geliştirilen ikiz dişlilere sahip öğütücü modeli sistemin daha verimli çalışmasını, daha az enerji harcamasını, daha düşük oranda istenmeyen maddelerin kontaminasyonunu ve daha yüksek oranda yağ eldesini mümkün kılmaktadır (29).



Şekil 2. Tek dişliye sahip mekanik öğütücülü pres

Çözücü destekli yağ ekstraksiyonu

Yağlı tohumlardan yağ eldesinde geleneksel olarak kullanılan presleme yöntemlerinin temel eksikliği olan düşük ekstraksiyon verimini arttırmak amacıyla günümüzde genellikle çözücü ekstraksiyonu veya çözücü destekli presleme kullanılmaya başlanmıştır (21, 28). Diğer yöntemlere kıyasla, çözücü destekli ekstraksiyonda yağ eldesi daha yüksek verimle gerçekleşmektedir (19). Bu durumdan dolayı, teknolojinin gelişmesiyle her ne kadar yeni ekstraksiyon yöntemleri ortaya çıksa da, çözücü destekli ekstraksiyon (soxhlet vb.) gibi geleneksel yöntemler sağladığı yüksek verimle, bu yeni yöntemlerin ne kadar başarılı olabildiğinin referansı olmuştur (18). Bu yöntemle yüksek verimde yağ elde edilmesinin temel nedeni, yüksek sıcaklığın, yağın hücrelerden ekstraksiyonu sırasında verim için en kritik unsurlardan biri olan hücre duvarlarını parçalayarak çözgenin kolayca hücre içine etki etmesidir (30).

Çözücü destekli yağ ekstraksiyonunda en önemli unsurların başında uygun çözücü seçimi gelmektedir. İdeal bir çözücü yağlar için yüksek çözme gücüne sahip olup, protein, amino asit ve karbonhidratlar için ise düşük çözme gücüne sahip veya hiç çözücü olmamalıdır. Tercih edilen çözücü aynı zamanda yağda kalıntı bırakmadan kolayca uzaklaştırılabilir, nem çekici özelliği ve kaynama noktası nispeten düşük olmalı ve hem sıvı hem de buhar fazda toksik özellik göstermeden örneğin partiküllerine kolayca nüfuz edebilmelidir (31). Bu özelliklere sahip oldukları için genellikle kloroform, dietil eter, petrol eteri ve hekzan gibi polar özellik göstermeyen çözücüler tercih edilirler (32). Ancak çözücü destekli ekstraksiyon yönteminde olumsuz olarak göze çarpan en belirgin husus, işlem sırasında çözücü kullanımıyla yağa geçen istenmeyen materyallerin, yağdan uzaklaştırılması ve insan tüketimine uygun hale getirilebilmesi için elde edilen ham yağın birtakım ardışık rafinasyon işlemlerine (nötralizasyon, ağartma, fosfolipidlerin uzaklaştırılması vb.) duyduğu ihtiyaçtır (8).

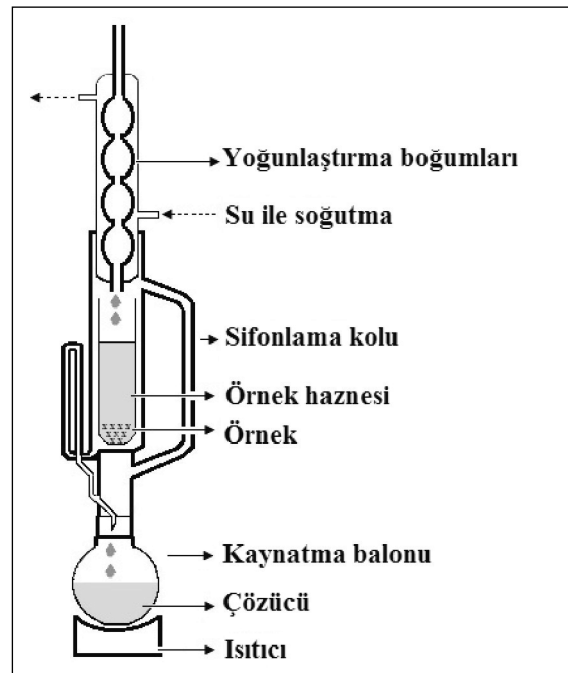
Sürekli ekstraksiyon sistemleri

Temel haliyle Butt tüpü, gelişmiş haliyle Twisselman ekstraktörü veya Goldfish aparatı olarak adlandırılan bu sistem, çözücü destekli sürekli ekstraksiyonun en yaygın kullanılan sistemlerinden biridir. Butt tüpü sistemine, çözgenin geri kazanımı için eklenmiş bir musluk ile geliştirilen ve daha endüstriyel bir hale dönüşen Goldfish sisteminde (33), kaynama balonunda kaynayan çözücü sürekli bir şekilde örneğin içinden geçerek seramik kapta toplanır ve yağ miktarı örnekteki ağırlık kaybına veya toplanan yağın ağırlığına bakılarak ölçülür. Sürekli metodun en önemli avantajı, çözücünün örneğe sürekli temasıyla daha hızlı ve bu nedenle daha kısa zamanda bir ekstraksiyon sağlarken, kısa süre içerisinde biten işlemin örnekte bulunan yağı tamamen çıkaramaması, metodun en önemli dezavantajıdır (31).

Yarı-sürekli ekstraksiyon sistemleri

Çözücü destekli yağ ekstraksiyonunda en yaygın kullanılan yarı sürekli ekstraksiyon yöntemi "Soxhlet" aparatı olarak adlandırılan veya aynı prensibe sahip olarak geliştirilmiş diğer otomatik sistemlerdir (Şekil 3). İlk olarak 1879 yılında Alman kimyager Franz Ritter Von Soxhlet tarafından

tasarlanan bu sistemin temel prensibi, belirli bir süre boyunca yarı sürekli bir şekilde ısıtılıp kaynatılan ve tekrar yoğunlaştırılan bir çözücünün selülozik bir yapı içerisinde bulunan katı materyalden yağı bünyesine hapsedip daha sonra elde edilen yağ-çözücü karışımından çözücünün uçurulması suretiyle yağın ekstrakte edilmesidir (18). Soxhlet aparatı, ayrışma evresinde, çözücünün katı örneğe tamamen nüfuz ettikten sonra periyodik olarak kaynama balonundan sifonlanmasına olanak sağlarken, diğer yöntemler ise yoğunlaşan çözücünün örnek içinden geçtikten sonra geri akışına dayandığı bir prensibe sahiptir (31). Ancak yağ eldesinde çözücü destekli yöntem, yapılan rafinasyon işlemlerine rağmen çözücü kalıntılarının son ürüne bulaşma riskinden dolayı diğer yöntemlere göre daha tehlikelidir. Örneğin; üzüm organik bağcılıkla yetiştirilmiş olsalar dahi, çekirdeklerinin yağları ekstrakte edilirken kullanılan çözücü, yağın organik özelliğini kaybettirmekte ve bu durum yağın ticari geleceğini tehdit etmektedir. Öte yandan, ekstraksiyon işlemi sırasında uygulanan yüksek sıcaklık ve basınç gibi parametrelere oldukça hassas olan biyoaktif bileşenler olumsuz yönde etkilemekte ve elde edilen yağın kalitesi düşmektedir. Ayrıca ekstraksiyon süresinin uzunluğu ve ekstraksiyonun tam verimle gerçekleşmesi için gereken yüksek miktarda çözücü ihtiyacı, sistemin diğer dezavantajlarıdır (8).



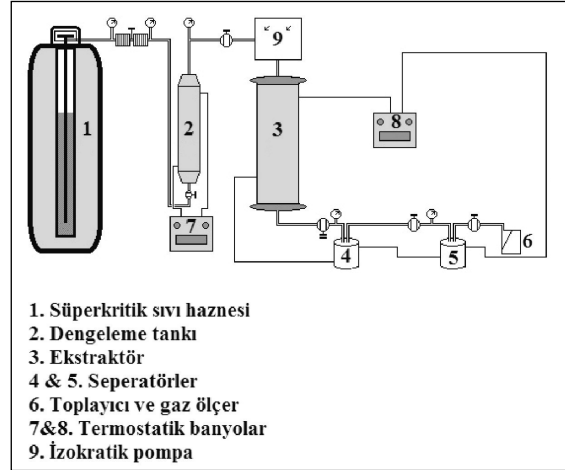
Şekil 3. Soxhlet düzeneği

Süperkritik sıvı destekli yağ ekstraksiyonu

Yağlı tohumlar gibi doğal kaynaklardan yağ ekstraksiyon işlemlerinde süperkritik sıvı desteği son yıllarda birçok araştırmanın temel konusu olmuş ve geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre önemli bir alternatif haline gelmiştir (34-36). Bu yöntem, çözücü maddelerin belirli bir sıcaklık ve basınç düzeyinin üzerinde süperkritik hale gelmesiyle, gaz-sıvı arası akışkan bir hale geçip, yüksek yoğunluk ve yayınlımda, düşük viskozitede bulunarak çözme ve nüfuz etme gücünün yükselmesiyle kütle transferinin artışı temel almaktadır (Şekil 4). İşlemden süperkritik çözücünün gücünün ve seçiciliğinin sürekli olarak kontrol altında tutulabilmesi, organik çözücü kullanılması ve bu sayede kontaminasyonun engellenmesi ve pahalı ardışık rafinasyon işlemlerini gerektirmemesi, sistemin en önemli avantajlarıdır. Bu ekstraksiyon yöntemi ayrıca; yüksek verimi, kolaylığı ve analiz süresinin kısalığı gibi diğer önemli üstünlüklere de sahiptir (36). Tüm bu avantajlarından dolayı süper kritik sıvı ekstraksiyon yönteminin son yıllarda endüstriyel olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Ekstraksiyon işlemi sırasında çözücünün süperkritik akışkanda iyi çözünmesi için özellikle basınç ve çözücü cinsi gibi faktörler sistemin verimliliğinde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle yöntem, kullanılmadan önce iyi bir optimizasyon çalışması gerektirir (37). Sistemin en önemli dezavantajı ise ilk kurulum sırasında ciddi yatırım maliyetleri içermesidir. Bitkisel yağların eldesinde süperkritik sistemlerde çözücü olarak kullanılan karbondioksit, sahip olduğu niteliksel ve çevresel avantajlarından dolayı son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Düşük kritik basınca (74bar) ve sıcaklığa (32°C) sahip olması, yanıcı ve toksik özellikler göstermemesi, düşük maliyette, yüksek saflıkta ve kolaylıkla ulaşılabilir olması, lipofilik çözübilirlik açısından polaritesinin sıvı pentanla benzer özellikler göstermesi ve ekstraktan kolayca uzaklaştırılabilir olması, karbondioksitin bu ekstraksiyon sisteminde çözücü olarak sıklıkla kullanılmasının en önemli sebepleridir (34-36).

Mikrodalga destekli yağ ekstraksiyonu

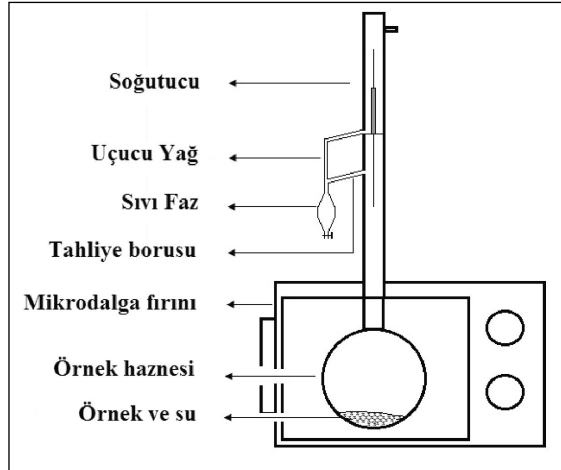
Analitik laboratuvarlarda kullanımına 1970'lerin sonunda başlanan mikrodalga destekli yağ ekstraksiyonu sistemi (Şekil 5), iyonların iletimi ve dipol rotasyonu yoluyla, mikrodalga enerjisinin molekül üzerine doğrudan etkisini temel alan bir



Şekil 4. Süperkritik sıvı destekli ekstraksiyon sistemi

premsibe dayanır (38). Yağ ekstraksiyonunda kullanılan geleneksel yöntemlerin aksine, ekstraksiyon verimliliğinin, kalitesinin ve kapasitesinin yüksek oluşu, işlem süresinin kısalığı, az miktarda enerji ve çözücü gereksinimi dolayısıyla maliyetinin daha düşük oluşu, mikrodalga enerjisinin kullanımına yönelik eğilimi arttırmıştır (39-41). Bunlara ek olarak, sistem moleküllerin kutuplarındaki yükseltgenen zayıf hidrojen bağlarını bozarak, klasik temas yoluyla ısı iletimi yöntemlerinin aksine, örneğin tamamını aynı anda ısıtması, ekstraksiyon verimini artırırken, çok yüksek ısılara çıkılmaması da ısıyla bozulabilen α -tokoferol, α ve γ -tokotrienoller gibi hassas bileşiklerin parçalanmasını engellemektedir. Ayrıca bu yöntem sayesinde yağ bünyesinde korunan tokotrienol miktarı, yağın kalitesine önemli bir katkı yapar, çünkü tokotrienoller yağın nutrasötik kullanımına şans tanır. Çekirdeklerin mikrodalga sisteminde hızlı bir şekilde kurutulması, gelişen fitoetik endüstri için de iyi kalitede yağ üretilmesinde gerekli parametrelerin düzenli olarak kontrol altında tutulabilmesini sağlar (42). Mikrodalga sisteminde ekstraksiyon verimini doğrudan etkileyen bir diğer parametre ise uygun çözücü seçimidir. Seçilen çözücünün mikrodalga ışınlarını iyi absorplaması, analitin matrisiyle iyi etkileşmesi, analiti çözebilir olması, işlemin gerçekleştirileceği sıcaklıklarda ısınma hızı-dipol moment uyumuna sahip olması gerekmektedir (38). Verimlilik açısından çözücünün önemli bir etkisi olsa da, son zamanlarda yapılan çalışmalarda mikrodalga ekstraksiyonunun çevre dostu profiline katkıda bulunan çözücsüz (solvent-free) denemeler yapılmıştır. Bu yöntemin, ilerleyen yıllarda

bünyesinde mikrodalga ışmasını en iyi absorplayan organik asitleri bulunduran bitkisel esansiyel yağların ve yağlı tohumlardan yağ ekstraksiyonlarında kullanılması beklenmektedir (43, 44).

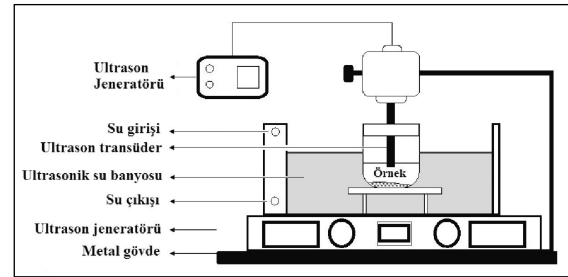


Şekil 5. Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi

Ultrases destekli yağ ekstraksiyonu

Yüksek frekanslara sahip, mekaniksel nitelikte bir enerji biçimi olan ultrases, ısısal olmayıp, etkili ve emniyetli bir şekilde hücre duvarlarını parçalayabilme özelliğiyle son yıllarda yağ ekstraksiyonlarında kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 6). Ultrases destekli yağ ekstraksiyonu, diğer geleneksel ekstraksiyon yöntemlerindeki yüksek hacimde çözücü gereksinimi, düşük verimde yağ eldesi ve elde edilen yağın istenilen kalitede olmaması gibi eksikliklerden doğan ihtiyaç üzerine geliştirilmiştir (19, 45). Bu yöntemde ultrases desteği, kütle transferini kuvvetlendirip, çözücünün hücre duvarlarına ve içine nüfuz etme gücünü artırarak, yağın kolayca elde edilmesini sağlamaktadır. Hücre duvarının ortadan kalkması ve partikül çapının azalması suretiyle katı ve sıvı kısımlar arasındaki yüzey alanı ve etkileşimin artması, çözücünün dokulara doğru olan dağılımını hızlandırmakta ve bu sayede ekstraksiyon işlemi daha kısa sürelerde gerçekleşmektedir (45). Ultrases destekli yağ ekstraksiyonda önemli olan başlıca unsurlar; dokunun doğal yapısı ve ekstrakte edilecek yağ bileşiklerinin doku yapısındaki konumu, ekstraksiyon gerçekleşecek hücrelere uygulanan ön işlemler, ultrases ekstraksiyonunun dokular üzerine etkisi ve artan ekstraksiyon verimi olarak sıralanmaktadır (46). Samaram ve ark.

(47) papaya tohumlarındaki uçucu yağların ekstraksiyonunda ultrases destekli ekstraksiyon ile çözücü destekli (soxhlet) ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırılmış ve istenilen fizikokimyasal özelliklerin sağlanmış olması, stabil olması ve ekstraksiyonun kısa sürede verimli bir şekilde gerçekleşmesinden dolayı ultrases destekli yöntemin, çözücü ekstraksiyonuna göre oldukça avantajlı olduğunu tespit etmişlerdir.



Şekil 6. Ultrases destekli yağ ekstraksiyon sistemi

Enzim destekli sulu ortamda yağ ekstraksiyonu

Yağlı tohumlardan yağ ekstraksiyonunda kullanılan çözücü emisyonlarının Çevre Koruma Ajansı tarafından hava kirliliğine sebep olan önemli kaynaklardan biri olarak gösterilmesi ve bu çözücülere getirilen kısıtlamalarla birlikte son yıllarda artan alternatif çevreci ekstraksiyon yöntem arayışı, enzim destekli sulu ekstraksiyon yöntemine olan ilgiyi oldukça arttırmıştır (21, 48). Enzim destekli sulu ekstraksiyon, herhangi bir organik çözücü madde kullanmaksızın, yağ ve suyun birbirleri içindeki çözünmezliğinden yararlanarak, hücre duvarlarının uygun enzimler yardımıyla hidroliz edilerek yağın eldesi prensibine dayanan güvenli bir ekstraksiyon yöntemi olarak bilinmektedir (48, 49). Uygun enzimlerin doğru etkileşimiyle ve seçilen enzimlerin etkili kullanımı için yapılacak yöntem optimizasyonu, yağ ekstraksiyon veriminin önemli ölçüde artabileceği tespit edilmiştir (49). Bu yöntemde ekstraksiyon verimine etki eden en önemli faktörler; kullanılan enzimlerin bileşimi, ortam koşulları (pH, sıcaklık), süre, tanecik büyüklüğü, çalkalama hızı ve katı-sıvı oranıdır (48). Yağ keseciklerinin yüzeylerini tamamen kaplayan dış yapı, sterik engel etkisinin yanı sıra oleozin gibi hidrofobik proteinlerin elektronegatif itme aktivitesinden kaynaklanan yapısal bir yüzey stabilitesine sahiptir ve bu nedenle kolayca yıpranma ve bozulmaya

uğramamaktadırlar (48, 49). Hücre duvarının yanı sıra, lif tabakası gibi matristeki diğer engel teşkil edecek yapıları da dikkate alarak, yağ ekstraksiyon verimini arttıran en uygun enzimler seçilmelidir. Bu anlamda en sık kullanılan enzimler olan proteazlar, kotiledon yapıdaki hücre duvarlarının ve yağsı membran tabakaların yıkımında önemli rol oynarlar. Öte yandan proteolitik enzimler oleozinlerin hidrolizinde etkili olurken bu sayede lifofilik proteinlerin oluşturduğu yüzey aktivitesini düşürmekte ve yağın hücre içerisinden kolayca tahliyesini sağlamaktadır (48). Tüm bu yapısal özellikler göz önüne alındığında başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için, pektinaz, selüloz, hemiselüloz ve proteaz gibi enzimler bir arada kullanılmaktadır (49). Yöntemde organik çözücü kullanılmaması ve bu sayede zehirli kabul edilen çözücü kalıntıları bırakmamasıyla birlikte, yangın ve patlama riski bulundurmuyarak daha güvenli çalışma olanağı sunması, uygun işletme koşulları ve birçok farklı tohumlarla çalışılabilmesi, enzim destekli sulu ortamda yağ ekstraksiyon metodunun en önemli avantajlarıdır (48, 50). Ayrıca, hedeflenen bileşenlerin nitelikleri değişmeden ve yan ürün oluşmadan gerçekleşen ekstraksiyonla elde edilecek yağın en önemli kalite parametreleri olan kendine özgü tadının ve kokusunun korunmasına katkıda bulunarak yöntemi diğer metotlara göre tercih edilir kılmaktadır. Ancak kullanılan enzimlerin ticari anlamda satışının yaygın olmayışı ve enzim fiyatlarının nispeten yüksek oluşu, uzun işlem süresi, enzim uygulamasından sonra kurutma işlemi için harcanan ekstra maliyet ve elde edilen yağın emülsifikasyonundan kaynaklanan ardışık işlemler ve diğer bazı ticari yöntemlere göre düşük ekstraksiyon verimi, bu yöntemin geleceği için önemli tehditler oluşturmaya devam etmektedir (50).

SONUÇ

Şaraphane ve meyve suyu işletmelerinin atığı olan üzüm posasının önemli bir kısmını oluşturan zengin yağ içeriğine sahip üzüm çekirdekleri, son yıllarda üzüm çekirdeği yağı olarak birçok farklı alanda değerlendirilmektedir. Bu yağın eldesinde geçmişten günümüze birçok farklı ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiş, bu yöntemler elde edilecek yağın kullanım alanına göre farklı

unsurların etkisiyle (presleme, sıcaklık, basınç, ultrases, mikrodalga, enzim vb.) çeşitlendirilmiştir. Sıcaklık ve basınç gibi parametrelere hassas olan biyoaktif bileşenlerin kaybına sebep olmamak için, kullanılacak ekstraksiyon yöntemi çok dikkatle seçilmelidir. Yöntem seçiminde dikkat edilecek iki temel unsur; (1) ekstraksiyon veriminin yüksek olması, (2) çekirdek yağının biyoaktif bileşenlerinin zarar görmemesidir. Son yıllarda teknolojinin hızla ilerlemesiyle daha hassas yöntemler geliştirilmesi ve yeni yöntemlerin yaygınlaşması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. FAO. Year Production, Statistics, FAOSTAT, 2013 Grape Production. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> Erişim tarihi: 5 Mayıs 2015.
2. Brianceau S, Turk M, Vitrac X, Vorobiev E. 2015. Combined densification and pulsed electric field treatment for selective polyphenols recovery from fermented grape pomace. *Innov Food Sci Emerg*, 29: 2-8.
3. Semerci A, Kızıltuğ T, Çelik AD, Kiracı MA. 2015. Türkiye bağcılığının genel durumu. *MKU Ziraat Fak Der*, 20 (2): 45-51.
4. TÜİK. 2015. Türkiye İstatistik Kurumu. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Verileri. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 (Erişim tarihi: 21 Nisan 2016).
5. Demirtaş İ, Pelvan E, Özdemir İS, Alasalvar C, Ertaş, E. 2013. Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey. *Eur J Lipid Sci Tech*, 115: 641-647.
6. Barba FJ, Zhu Z, Koubaa M, Sant'ana AS. 2016. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products. *Trends Food Sci Tech*, 49: 96-109.
7. Teixeira A, Baenas N, Dominguez-Perles R, Barros A, Rosa E, Moreno DA, Garcia-Viguera C. 2014. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters. *Int J Mol Sci*, 15: 15638-15678.
8. Fiori L. 2007. Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: Critical approach and modeling. *J Supercrit Fluid*, 43: 43-54.

9. Pehlivan EC, Uzun Hİ. 2015. Shiraz üzüm çeşidinde salkım seyreltmesinin verim ve kalite özellikleri üzerine etkileri. *YYÜ Tarım Bil Der*, 25(2): 119-126.
10. Barbieri L, Andreola F, Lancellotti I, Taurino R. 2013. Management of agricultural biomass wastes: Preliminary study on characterization and valorisation in clay matrix bricks. *Waste Manage*, 33: 2307-2315.
11. Rombaut N, Savoie R, Thomasset B, Castello J, Van Hecke E, Lanoisellè. 2015. Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grapeseed cold screw pressing. *Ind Crop Prod*, 63: 26-33.
12. Hanganu A, Todaşca M-C, Chira N-A, Maganu M, Roşca S. 2012. The compositional characterisation of Romanian grape seed oils using spectroscopic methods. *Food Chem*, 134: 2453-2458.
13. Karaman S, Karasu S, Tornuk F, Toker OS, Geçgel Ü, Sağdıç O, Özcan N, Gül O. 2015. Recovery potential of cold press byproducts obtained from the edible oil industry: Physicochemical, bioactive, and antimicrobial properties. *J Agr Food Chem*, 63: 2305-2513.
14. Sabir A, Ünver A, Kara Z. 2012. The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *J Sci Food Agr*, 92: 1982-1987.
15. Fernandes L, Casal S, Cruz R, Pereira JA, Ramalhosa E. 2013. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Res Int*, 50: 161-166.
16. Rubio M, Alvarez-Ort M, Alvarruiz A, Fernández E, Pardo JE. 2009. Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development. *J Agr Food Chem*, 57: 2812-2815.
17. Podolyan A, White J, Jordan B, Winefield C. 2010. Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Funct Plant Biol*, 37: 767-784.
18. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *J Food Eng*, 117: 426-436.
19. Da Porto C, Porretto E, Decorti D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrason Sonochem*, 20: 1076-1080.
20. Malicanin M, Rac V, Antic V, Antic M, Palade LM, Kefalas P, Rakic V. 2014. Content of antioxidants, antioxidant capacity and oxidative stability of grape seed oil obtained by ultra sound assisted extraction. *J Am Oil Chem Soc*, 91: 989-999.
21. Campbell KA, Vaca-Medina G, Glatz CE, Pontalier P-Y. 2016. Parameters affecting enzyme-assisted aqueous extraction of extruded sunflower meal. *Food Chem*, 208: 245-251.
22. Maier T, Schieber A, Kammerer DR, Carle R. 2009. Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem*, 112: 551-559.
23. Lutterodt H, Slavin M, Whent M, Turner E, Yu L. 2011. Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chem*, 128: 391-399.
24. Karabaş H. 2013. Soğuk pres ve solvent ekstraksiyon teknikleri ile üretilen aspir yağı ve aspir biyodizellerinin yağ ve yakıt özelliklerinin incelenmesi. 28. Ulusal Tarımsal Mekanizasyon Kongresi, 4-6 Eylül, Konya, Türkiye, 30-36.
25. Zhao X, Wei L, Julson J, Huang Y. 2014. Investigated cold press oil extraction from non-edible oilseeds for future bio-jet fuels production. *J Sust Bioenergy Syst*, 4: 199-214.
26. Kamau JM, Nanua JN. 2008. Storage stability of ram press extracted semi-refined sunflower oil. *Agric Trop Subtrop*, 41 (3): 106-109.
27. Fernández CM, Fiori L, Ramos MJ, Pérez , Rodríguez JF. 2015. Supercritical extraction and fractionation of *Jatropha curcas* L. oil for biodiesel production. *J Supercrit Fluid*, 97: 100-106.
28. Rombaut N, Savoie R, Thomasset B, Bélliard T, Castello J, Van Hecke É, Lanoisellè J-L. 2014. Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *CR Chim*, 17: 284-292.
29. Isobe S, Zuber F, Uemura K, Noguchi A. 1992. A new twin-screw press design for oil extraction of dehulled sunflower seeds. *J Am Oil Chem Soc*, 69 (9): 884-889.

30. Bai X, Naghdi FG, Ye L, Lant P, Pratt S. 2014. Enhanced lipid extraction from Algae using free nitrous acid pretreatment. *Bioresource Technol*, 159: 36-40.
31. Nielsen SS (ed). 2010. *Food Analysis*. Springer, New York, NY, USA, 550 p.
32. Halim R, Danquah MK, Webley PA. 2012. Extraction of oil from Microalgae for biodiesel production. *Biotechnol Adv*, 30: 709-732.
33. ElZibair NMK. 2015. Phyto-chemical screening of seeds and physicochemical characterization of the oil of *Citrullus Colocynthis*. Ph. D. Dissertation, Sudan University of Science and Technology, Sudan, 44 p.
34. Fornari T, Vicente G, Vázquez E, Garcia-Risco MR, Reglero G. 2012. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *J Chromatogr A*, 1250: 34-48.
35. Martin L, Skinner C, Mariott RJ. 2015. Supercritical extraction of oil seed rape: Energetic evaluation of process scale. *J Supercrit Fluid*, 105: 55-59.
36. Lindy J (ed). 2015. *Supercritical fluid extraction technology, applications and limitations*. Nova Science Publishers, New York, USA, 143 p.
37. Jokic S, Bijuk M, Aladic K, Bilic M, Molnar M. 2016. Optimisation of supercritical CO₂ extraction of grape seed oil using response surface methodology. *Int J Food Sci Tech*, 51: 403-410.
38. Büyüktuncel E. 2012. Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri. *Hacettepe Üni Eczacılık Fak Der*, 32 (2): 209-242.
39. Terigar BG, Balasubramanian S, Sabliov CM, Lima M, Boldor D. 2011. Soybean and rice bran oil extraction in a continuous microwave system: From laboratory- to pilot-scale. *J Food Eng*, 104: 208-217.
40. Tunç İ, Çalışkan F, Özkan G, Karacabey E. 2014. Mikrodalga destekli soxhlet cihazı ile fındık yağı ekstraksiyonunun yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu. *Akad Gıda*, 12 : 20-28.
41. Kaya D, Ergönül PG. 2015. Uçucu yağları elde etme yöntemleri. *Gıda*, 40 (5): 303-310.
42. Oomah BD, Liang J, Godfrey D, Mazza G. 1998. Microwave heating of grapeseed: Effect on oil quality. *J Agr Food Chem*, 46: 4017-4021.
43. Filly A, Fernandez X, Minuti M, Visinoni F, Cravotto G, Chemat F. 2014. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: From laboratory to pilot and industrial scale. *Food Chem*, 150: 193-198.
44. Zhang DY, Yao XH, Luo M, Zhao CJ, Yu YJ. 2016. Optimization of negative pressure cavitation-microwave assisted extraction of yellow horn seed oil and its application on the biodiesel production. *Fuel*, 166: 67-72.
45. Bayraktaroğlu G, Obuz E. 2006. Ultrasound yönteminin ilkeleri ve gıda endüstrisinde kullanımı. 9. Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs, Bolu, Türkiye, 57-60.
46. Vilku K, Mawson R, Simons L, Bates D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry. *Innov Food Sci Emerg*, 9: 161-169.
47. Samaram S, Mirhosseini H, Tan CP, Ghazali HM. 2014. Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seedoil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Ind Crop Prod*, 52: 702-708.
48. de Moura JMLN, Campbell K, Mahfuz A, Jung S, Glatz CE, Johnson L. 2008. Enzyme assisted aqueous extraction of oil and protein from soybeans and cream de-emulsification. *J Am Oil Chem Soc*, 85: 985-995.
49. Passos PC, Yilmaz S, Silva CM, Coimbra MA. 2009. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chem*, 115: 48-53.
50. Yusoff MM, Gordon MH, Niranjan K. 2015. Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods. *Trends Food Sci & Technol*, 41: 60-82.

İçindekiler / Content

- Savran D, Halkman AK; Yoğurt fermantasyonu sırasında *Salmonella* Enteritidis'in farklı inokülasyon koşullarında canlı kalma durumunun araştırılması / *Investigation of survival of Salmonella Enteritidis during yogurt fermentation at different inoculation levels* **1-7**
- Kankaya DA, Tuncer BÖ, Tuncer Y; Gıda kaynaklı enterokokların potansiyel risk faktörleri / *Potential risk factors of food originated Enterococci* **8-19**
- Alkaya GB, Erdoğan F, Ekiz Hİ; Kızılötesi uygulama ile yüzey dekontaminasyon prosesi sırasında yumurta kabuğu yüzey sıcaklığının kızılötesi termografi ile belirlenmesi / *Determination of surface temperature of shell-eggs by using infrared thermography during infrared surface decontamination process* **20-26**
- Özen BÖ, Soyer A; Bitkisel ekstraktların dondurularak depolanan uskumru (*Scomber scombrus*) kıymasındaki kalite değişimlerine etkisi / *Effects of plant extracts on quality alteration in mackerel (Scomber scombrus) mince during frozen storage* **27-36**
- Çabuk H; *Liquid chromatographic determination of synthetic antioxidant content of some vegetable oils produced in Turkey* / Türkiye'de üretilen bazı bitkisel sıvı yağların sentetik antioksidan içeriklerinin sıvı kromatografisi ile belirlenmesi **37-42**
- Tuta S, Palazoğlu TK; *Effect of baking and frying methods on quality characteristics of potato chips* / Kızartma ve fırınlama yöntemlerinin patates cipslerinin kalite özellikleri üzerine etkisinin incelenmesi ... **43-49**
- Demirkesen İ; Farklı mumlarla oluşturulan oleojellerin reolojik ve tekstürel özellikleri / *Rheological and textural characteristics of oleogels formed by different waxes* **50-57**
- Saygılı D, Karagözlü C; Bakteriyofaj enkapsülasyonu ve potansiyel uygulamaları / *Bacteriophage encapsulation and potential applications* **58-66**
- Yeğin S; *Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerin belirlenmesi / *Determination of the bioprocess parameters effecting xylanase production by Aureobasidium pullulans* **67-75**
- Darıcı M, Cabaroğlu T; Türkiye'de farklı coğrafi yörelerde üretilen kalite Kalecik Karası kırmızı şaraplarının duyu tanımlayıcılarının belirlenmesi / *Determination of sensory descriptors of quality Kalecik Karası wines produced from different geographic regions in Turkey* **76-85**
- Darıcı M, Karaoğlan SY, Çelik ZD, Cabaroğlu T; Bornova Misketi şaraplarının duyu tanımlayıcılarının belirlenmesi / *Sensory properties of Bornova Muscat wines* **86-94**
- Sevindik O, Selli S; Üzüm çekirdek yağı eldesinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri / *The extraction methods of grape seed oil* **95-103**