

# GIDA



*THE JOURNAL OF FOOD*

E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 42

SAYI / NUMBER : 3

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: 3 • 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

**Editörler / Editors**

Halkman, A. Kadir *Ankara University, Turkey*  
Çakır, İbrahim *Abant İzzet Baysal University, Turkey*  
Erinç, Hakan *Ömer Halisdemir University, Turkey*  
Taban, Birce *Ankara University, Turkey*  
Özden, Özkan *Istanbul University, Turkey*

**Yönetim Yeri**

**Adres / Address**

Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey

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

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

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

**Yayın Türü:** Yaygın süreli ve hakemli

**Hazırlayan / Prepared**

Onay Ofset Matbaacılık  
G.M.K. Bulvarı No: 108/1  
Maltepe / Ankara Turkey  
Tel : (+90) 312 230 22 09  
e-mail: onayofset@gmail.com

**Yayın Tarihi / Publication Date**

15 06 2017

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Alichanidis, Efstathios *Aristotle University of Thessaloniki, Greece*  
Artık, Nevzat *Ankara University, Turkey*  
Baysal, Taner *Ege University, Turkey*  
Boyacı, İsmail Hakkı *Hacettepe University, Turkey*  
Certel, Muharrem *Akdeniz University, Turkey*  
Draughon, Ann *Tennessee University, USA*  
Ekşi, Aziz *Ankara University, Turkey*  
El Soda, Morsi *University of Alexandria, Egypt*  
Fogliano, Vincenzo *University of Napoli Federico II, Italy*  
Ghosh, Bikash C. *National Dairy Research Institute, India*  
Gollop, Natan *The Volcani Center, ARO, Israel*  
Gökmen, Vural *Hacettepe University, Turkey*  
Griffiths, Mansel *University of Guelph, Canada*  
Göğüş, Fahrettin *Gaziantep University, Turkey*  
Gümüşkesen, Aytaç Saygın *Ege University, Turkey*  
Güven, Mehmet *Cukurova University, Turkey*  
Heperkan, Dilek *Istanbul Technical University, Turkey*  
Ho, Chi-Tang *The State University of New Jersey, USA*  
Kaya, Mükerrerem *Atatürk University, Turkey*  
Kaymak-Ertekin, Figen *Ege University, Turkey*  
Koçak, Celalettin *Ankara University, Turkey*  
Köksel, Hamit *Hacettepe University, Turkey*  
Morales, Francisco J. *CSIC Instituto del Fr o, Spain*  
Mujtaba, Mustafa G. *Florida Gulf Coast University, USA*  
Özilgen, Mustafa *Yeditepe University, Turkey*  
Paalme, Toomas *Tallinn University of Technology, Estonia*  
Parlar, Harun *Technical University of Munich, Germany*  
Raspor, Peter *University of Primorska, Slovenia*  
Rezessy-Szabo, Judit M. *Corvinus University of Budapest, Hungary*  
Şahin, Serpil *Middle East Technical University, Turkey*  
Şanlıbaba, Pınar *Ankara University, Turkey*  
Üstünoğlu, Zeynep *Michigan State University, USA*  
Yetişemiyen, Atila *Ankara University, Turkey*

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

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

# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Şahin-Nadeem, H., Topuz, A. Arslan Kulcan A., Torun, M., Özdemir, F.; *Colour change and weight loss during the roasting process for production of carob powder / Keçiboynuzu tozu üretiminde kavurma prosesi süresince renk değişimi ve ağırlık kaybı* ..... 252-260
- Yıldız, S., Yılmaz, A., Can, Z., Kılıç, C., Yıldız, Ü. C.; *Total phenolic, flavonoid, tannin contents and antioxidant properties of Pleurotus ostreatus and Pleurotus citrinopileatus cultivated on various sawdust / Çeşitli talaşlarda üretilen Pleurotus ostreatus ve Pleurotus citrinopileatus mantarlarının toplam fenolik, flavonoid ve tanen içerikleri ve antioksidan özellikleri* ..... 315-323
- Owaid, M. N., Muslat, M. M., Abed, I. A.; *Content of protein and ortho-dihydric phenol in Agaricus bisporus X25 cultivated on decomposed agrosubstrates / Farklı kompostlarda üretilen Agaricus bisporus X25 mantarlarının protein ve orto-dihidrik fenol içerikleri* ..... 324-328
- Sutay Kocabaş, D., Yurtdaş, E., Demir, A. N.; *Valorization of olive-oil industry solid waste: Statistical optimization of alkaline extraction conditions for light-coloured hemicelluloses / Zeytinyağı endüstrisi katı atığının değerlendirilmesi: Açık renkli hemiselülozlar için alkali özütleme koşullarının istatistiksel optimizasyonu* ..... 329-338

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Kormalı Ertürün, H. E.; Bazı içeceklerde titrasyon asitliğinin tayini için zofenopril kalsiyuma dayanan pH elektrot yapımı / *Construction of a pH electrode based on zofenopril calcium for the determination of titratable acidity in some beverages* ..... 211-218
- Kılınççeker, O.; Tara, tragakant ve agar agar gamlarının tavuk köftelerde kullanımı / *The use of tara, tragakant and agar agar gums in chicken meatballs* ..... 219-228
- İnci, A., Ünübol Aypak S., Güven, G.; Aydın ilinde üretilen inek sütlerinde bazı ağır metal düzeylerinin araştırılması / *Investigation of some heavy metal levels in cow milk collected from Aydın province* ..... 229-234
- Arpa, T. E., Cabaroğlu, T.; Elazığ yöresinde yetiştirilen Kösetevек üzüm çeşidinin kırmızı şarap üretimine uygunluk durumunun belirlenmesi / *Determination of suitability of K setevек grape variety cultivated in Elazığ province for the production of red wine* ..... 235-241
- Gül, Ü. D., Silah, H.; Tarımda kullanılan atrazinin gideriminde *Rhizopus arrhizus* kullanım potansiyelinin belirlenmesi / *Determination the potential usage of Rhizopus arrhizus for removal of atrazine used in agriculture* ..... 261-267
- Polat Yemiş, G., Karagöz Emiroğlu, Z., Candoğan, K.; Mercanköşk (*Oreganum heracleoticum* L.) ve bahçe kekiği (*Thymus vulgaris* L.) uçucu yağı içeren soya bazlı yenilebilir filmlerin patojen bakterilere karşı antimikrobiyel etkileri / *Antimicrobial effects of soy protein based edible film containing oregano (Oreganum heracleoticum L.) and thyme (Thymus vulgaris L.) essential oils against foodborne pathogens* ..... 268-276
- Sezer, E., Ayhan, Z., Çelikkol, T., Güner, F.; Zeolit katkılı aktif polietilen ambalaj malzemesinin kivi meyvesinin kalite özellikleri ve raf ömrüne etkisi / *Effect of zeolite added active packaging material on the quality and shelf life of kiwifruit* ..... 277-286
- Can, N., Duraklı Velioglu, S.; Tekirdağ'da satışı sunulan ıhlamur (*Tilia* spp.) ve kuşburnu (*Rosa canina*) örneklerinde aflatoksin varlığının araştırılması / *Determination of aflatoxins in linden (Tilia spp.) and rosehip (Rosa canina) samples sold in Tekirdağ province* ..... 287-296
- Karaça, A. C., Başkaya, H., Güzel, Ö., Ak, M. M.; Püskürtmeli kurutma işleminin meyve suyu konsantrelerinin fenolik madde içeriğine ve antioksidan aktivitesine etkisi / *Effect of spray drying on phenolic content and antioxidant activity of fruit juice concentrates* ..... 297-304
- Kesmen, Z., Büyükkiraz, M. E., Kahraman, N., Yetim, H.; Gıdalarda hile amacıyla kullanılan bazı bitki kaynaklı bileşenlerin gerçek zamanlı PZR ile tespiti / *Detection of fraudulent practices involving some plant derived compounds in foods using real-time PCR* ..... 305-314

## Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Yüce, S., Tahtacı, S., Başyigit Kılıç, G.; Halofilik laktik asit bakterilerinin ürettiği hidrolitik enzimler / *The hydrolytic enzymes produced by halophilic lactic acid bacteria* ..... 242-251

# Editörden,

---

## Merhaba,

Nisan 2017 ortasında GIDA Dergisi, 2017 yılının 42. cilt 3. sayısını (Mayıs-Haziran) yayımlıyoruz. Dergimizin elektronik ortamdaki baskı tarihi, yayımlama tarihi dikkate alındığında, kâğıt baskılı dergi yayımladığımız tarihlerde de her zaman kâğıt baskı tarihinin önünde idi.

Bu sayımızda 15 makale yayımladık. Bunların 4 adedi İngilizce araştırma, 10 adedi Türkçe araştırma ve 1 adedi Türkçe derleme makalesidir.

GIDA Dergisi açısından çok önemli gelişmeler var:

- İngilizce araştırma makale sayısında giderek bir artış var.
- 2017 yılının ilk çeyreğinde 32 makale geldi, bunların 28 adedi araştırma makalesi.
- GIDA Dergisi 32. Cilt 4. sayısındaki (Temmuz-Ağustos) 4 makale elektronik ortamda yayımlandı.
- TÜBİTAK ULAKBİM tarafından taranan tüm Türkiye çıkışlı dergiler içinde saygınlığımız her geçen gün daha fazla artıyor.

Ancak istediğimiz / beklediğimiz hedefe henüz erişemediğimiz de açıktır. GIDA Dergisi editörleri olarak elimizden gelenin çok üzerinde gayret gösteriyoruz ama meslektaşlarımızdan daha fazla destek bekliyoruz. Bu beklentimizin en önemli kısmını, meslektaşlarımızın İngilizce araştırma makalesi göndererek GIDA Dergisini evrensel boyuta taşımaları ve yayımladıkları makaleler ile GIDA Dergisine daha fazla atıf alınmasını sağlamaları oluşturmaktadır.

Dergi ile ilgili bir değişiklik, yeni yayım kurallarıdır. Tüm meslektaşlarımızın açıkça fark edeceği gibi, gerek metin içinde gerekse kaynak listesinde kullanılan kaynakçada ciddi bir değişiklik var. Bu değişiklik, bu sayımızda ve izleyen 2017 yılı 4. sayıda henüz tam olarak oturmuş olmayacak. Şöyle ki; GIDA Dergisi 2017 yılı 42. cilt 3. ve 4. sayılarında kimi makaleler eski kaynak bildirişi, kimi makaleler ise yeni kaynak bildirişi üzerinden yayımlanıyor.

Bir anlamda; aynı dergide yayımlanan farklı makalelerdeki kaynak bildirim kural uyumsuzluğu / farklılığı, doğrudan doğruya önceden kabul edilmiş makaleler ile ilgilidir. Bir diğer deyişle, eski yayım kurallarına göre kabul edilmiş makalelerin ya da belirli bir aşamaya gelmiş makalelerin yazarlarını, yeni yayım kurallarına uymaları açısından zorlamadık. Bu bir geçiş sürecidir.

3. Uluslararası Gıda Teknolojisi Kongresi ile ilgili olarak [www.gidadernegi.org](http://www.gidadernegi.org) sayfamızdan bizi takip edin. Kongre sitesi açıldı; <https://intfoodtechno2018.org/>

Sevgi ve saygılarımla,

Prof. Dr. A. Kadir Halkman



# A Message from the Editor-in-Chief

---

**Hello,**

In the midst of April 2017, we publish the 3<sup>rd</sup> issue of volume 42 (May-June) in Journal of FOOD. The date of printing of Journal of FOOD in electronic form, considering the date of its publication, was always in front of its paper-printing date as in the days of the paper-printed version of the journal.

We published 15 articles in this issue. Four of them are research articles in English, 10 of them are research articles in Turkish, and one of them is a review article in Turkish.

There are very important developments in terms of Journal of FOOD:

- There is an increase in the number of research articles in English.
- In the first quarter of the year 2017, thirty-two articles were submitted, of which 28 are research articles.
- The four of the articles in the 4<sup>th</sup> issue of volume 32 (July-August) of Journal of FOOD were printed in electronic media.
- Our reputation among all the journals published in Turkey which are indexed by TÜBİTAK ULAKBİM, increases day by day.

But it is also clear that we have not yet reached the target we wanted / expected. As the editors of Journal of FOOD, we try harder than we can get, but we expect much more support from our colleagues. The most important part of this anticipation is that our colleagues have made it possible to move the Journal of FOOD to a universal dimension by submitting research articles in English and to get more citation to the articles published in Journal of FOOD.

A change in the journal is the new writing rules. As all of our colleagues will clearly notice, there is a serious change in the reference used both in the text and in the reference list. This change will not yet be fully-established in this issue and in the next 4<sup>th</sup> issue of the year 2017. Namely; some of the articles published in the 3<sup>rd</sup> and the 4<sup>th</sup> issues of volume 42 of the year 2017 are published in Journal of FOOD, on the basis of old reference list rules and some others are of new reference list rules.

In a sense; the incompatibility / difference of the reference list rules in different articles published in the same issue, is directly related to previously accepted articles. In other words, we did not force the authors of accepted articles which were written according to the old writing rules or articles of a certain stage of reviewing process, with the new writing rules. This is a transition period.

Follow us about the 3<sup>rd</sup> International Congress on Food Technology at [www.gidadernegi.org](http://www.gidadernegi.org). The Congress web site has been opened; <https://intfoodtechno2018.org/>

Best Regards,

Prof. A. Kadir Halkman

## BAZI İÇECEKLERDE TİTRASYON ASİTLİĞİNİN TAYİNİ İÇİN ZOFENOPRİL KALSİYUMA DAYANAN pH ELEKTROT YAPIMI

H. Elif Kormalı Ertürün\*

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara

Geliş tarihi / Received: 22.07.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 15.11.2016

Kabul tarihi / Accepted: 10.12.2016

### Öz

Bu çalışmada, bazı içeceklerde titrasyon asitliğinin tayini için kullanılabilir zofenopril kalsiyum'a (ZFNCa) dayanan yeni bir PVC membran pH elektrot geliştirilmiştir. Elektrot,  $20 \pm 1$  °C'de, 1.7–9.5 pH aralığında,  $44.1 \pm 1.7$  mV/pH'lik bir eğim göstermektedir. Ayrıca, bu elektrodun, 15 s'lik cevap süresi ve en az 12 aylık ömürle, iyi bir tekrarlanabilirliğe ve yeniden üretilebilirliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda, çeşitli iyonlar varlığında H<sup>+</sup> iyonuna karşı iyi bir seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Önerilen elektrot kullanılarak, bazı içeceklerdeki (portakal suyu, elma suyu, gazlı içecek, bira, şarap ve sirke) titrasyon asitliğinin tayininin yapılabileceği gösterilmiştir. Bulunan sonuçlar geleneksel cam pH elektrotla elde edilenlerle karşılaştırıldığında, %95 GS'de (güven seviyesi), aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, ZFNCa'a dayanan bu elektrodun, içeceklerdeki titrasyon asitliği tayininde cam elektroda alternatif olarak başarıyla kullanılabilirliği görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** PVC membran, pH elektrot, zofenopril kalsiyum, potansiyometri, pH ölçümü, titrasyon asitliği

## CONSTRUCTION OF A pH ELECTRODE BASED ON ZOFENOPRIL CALCIUM FOR THE DETERMINATION OF TITRATABLE ACIDITY IN SOME BEVERAGES

### Abstract

In this study, a new PVC membrane pH electrode based on zofenopril calcium (ZFNCa) available for the determination of titratable acidity in some beverages was developed. The electrode exhibited a slope of  $44.1 \pm 1.7$  mV/pH in the pH range 1.7–9.5 at  $20 \pm 1$  °C. Furthermore, it was observed that the electrode had good repeatability and reproducibility with a response time of 15 s and a lifetime of at least 12 months. Also, it was found to display good selectivity for H<sup>+</sup> ions in the presence of various ions. The applicability of the proposed electrode for the determination of titratable acidity in some beverages (orange juice, apple juice, fizzy drink, beer, wine and vinegar) was illustrated. It was seen that there were no significant differences between the results obtained with the proposed electrode and the traditional glass pH electrode at the 95% CL (confidence level). As a consequence, it was seen that the electrode based on ZFNCa could be successfully used as an alternative for glass electrode to determine the titratable acidity in beverages.

**Keywords:** PVC membrane, pH electrode, zofenopril calcium, potentiometry, pH measurement, titratable acidity

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ kormali@science.ankara.edu.tr,

☎ (+90) 312 212 6720/1147-1269,

☎ (+90) 312 223 2395

## GİRİŞ

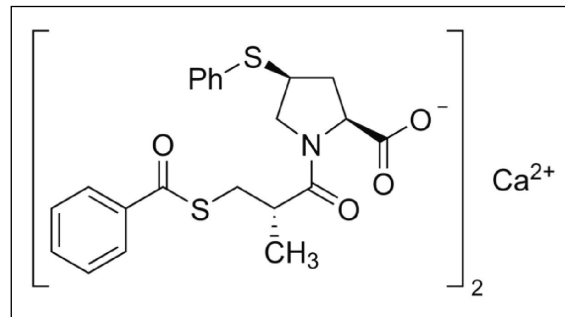
Asitlik; bir gıdanın içeriğinin ve kalitesinin değerlendirilmesi, gıdaya uygulanacak işlem koşullarının belirlenmesi ve bazı üretim süreçlerinin izlenmesi açısından önemli bir olgudur (1). Asitlik, pH ve titrasyon asitliği olmak üzere iki farklı şekilde ifade edilir. pH bir örneğin asitlik derecesi; titrasyon asitliği ise, o örnek içinde kuvvetli bir bazla titre edilebilen toplam hidrojen iyonu derişimidir (2).

Asitler; gıdaların doğal yapısında bulunabildikleri gibi, lezzet arttırmak, gıdanın raf ömrünü uzatmak ve benzeri amaçlarla işlenmeleri sırasında gıdalara katılabilirler (3). Sitrik, malik, tartarik, fosforik, okzalik, asetik ve laktik asitler gıdalarda yaygın olarak bulunan organik asitlerdir. Gazlı/gazsız içecekler ve taze meyvelerden üretilen sıvı gıdalar; imalat süreçleri ve elde edildikleri kaynaklar dolayısıyla, söz konusu asitlerin birini veya birkaçını içerebilirler. Bu nedenle, içecek ve sıvı gıdaların titrasyon asitliğinin, numunedeki baskın asit türü cinsinden ( $\frac{g_{asit}}{100 mL_{numune}}$ ) ifade edilmesi genel bir uygulamadır, ancak şart da değildir (1).

Çeşitli içeceklerin üretildiği gıda endüstrisinin gerektirdiği kalite ve güvenlik standartlarını sağlamak için yapılacak kalite-kontrol analizlerindeki asitlik ölçümlerinde kolay, hızlı, ucuz ve güvenilir analitik yöntemlere ihtiyaç vardır. Günümüzde, pH ve titrasyon asitliği ölçümleri, cam elektrotların indikatör elektrot olarak kullanıldığı potansiyometrik yöntemle gerçekleştirilebilmektedir. Cam elektrotlar; geniş pH aralığında yüksek seçicilikle güvenilir sonuçlar verdiklerinden ve inert olduklarından en yaygın kullanılan pH elektrotlarıdır. Anılan üstün özelliklerine rağmen, cam elektrotlar; yüksek dirence sahiptir, kolayca kırılabilir, hidroflorik asit (HF)/florür iyonu (F<sup>-</sup>) içeren ortamlarda kararsız sonuçlar verir ve pH skalasının uç bölgelerinde asit/alkali hatası oluştururlar. Ayrıca, mikroelektrot olarak üretilmeye ve in situ (yerinde) çalışmalarda kullanılmaya uygun değildirler (4, 5). Bu nedenle, son yıllarda, katı-temaslı elektrotlar (SCE'lar) (6-12), kaplanmış tel elektrotlar (CWE'lar) (13, 14), alan etkili transistörler (FET'ler) (15, 16), nano çubuk elektrotlar (17, 18) ve polimerik membran elektrotlar (PME'lar) (19-33) gibi cam olmayan pH elektrotların geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Poli(vinil klorür)'ün (PVC), uygun plastikleştirici, makrosiklik bileşik (iyonofor)

ve/veya iletkenlik arttırıcı ile belirli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanan PVC membran elektrotlar, düşük elektrik direncine sahip oldukları, kolay ve ucuz üretilibildikleri için diğerlerine nazaran tercih edilir hale gelmiştir.

PVC membran elektrotların ilgili iyon duyarlılıklarından ve seçiciliklerinden sorumlu bileşenleri ionoforlardır. Pek çok araştırmacı H<sup>+</sup> iyonuna duyarlı yeni ionoforlar geliştirmeye odaklanmıştır. Günümüze kadar, bu amaçla kullanılmış ionoforlara örnek olarak hekzaflorofosfatlar (34), diazasiklooktadekanlar (35), dekametilsiklopentasiloksanlar (6), hekzabutyl-tri-amidofosfatlar (19), heks-3-enler (20), azoller (21), fenokzazin bileşikleri (kromoiyonoforlar) (10, 27, 28), aminler (11-13, 24), pillar[5]arenler (29), ve kaliks[4]arenler (30-33) gösterilebilir. Literatür incelendiğinde, bazı ilaç etken maddelerinin voltametrik/amperometrik sensörlerde duyarlılık sağlamak amacıyla kullanıldığı (36, 37), ancak, pH duyarlı potansiyometrik PVC membran elektrot hazırlanmasında ionofor olarak kullanılmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bir hipertansiyon ilaç etken maddesi olan zofenopril kalsiyumun (ZFNCa) (Şekil 1) çeşitli pH'larda kare dalga voltamogramları alındığında, pik potansiyellerinin pH ile Nernstian değere yakın bir eğimle doğrusal olarak değiştiği görülmüştür (37). Bu gözleme dayanarak, sunulan çalışmada ZFNCa'un ionofor olarak kullanıldığı yeni bir PVC membran pH elektrot geliştirilmesi amaçlanmıştır. En iyi membran bileşiminin belirlenmesi için; ionofor, plastikleştirici, PVC ve iletkenlik arttırıcı oranları değiştirilerek çeşitli kombinasyonlarda membranlar hazırlanması düşünülmüştür. Geliştirilecek elektrodun, bazı anyon ve katyonlara karşı seçiciliği, cevap süresi, ömrü, çalışma aralığı gibi performans özelliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir.



Şekil 1 Zofenopril kalsiyumun formülü  
Figure 1 The structure of zofenopril calcium

Ayrıca, söz konusu elektrodun, bazı meyve suları, gazlı içecekler, sirke, bira ve şarapta titrasyon asitliğinin belirlenmesinde cam elektrot yerine kullanılabilirliği incelenmiştir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### Cihazlar ve donanımı

pH-potansiyel ölçümleri, Rondolino numune değiştiricili Mettler-Toledo SevenMulti pH-iyonmetre (İsviçre) ile otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. Referans elektrot olarak Mettler-Toledo Inlab Ag/AgCl (katalog no: 51343190) ve indikatör elektrot olarak hazırlanan PVC membran pH elektrotlar kullanılmıştır. Sonuçları karşılaştırmak için pH ölçümleri kombine cam elektrot (Mettler-Toledo Inlab Routine Pro pH elektrot; katalog no: 51343055) ile de yapılmıştır. Potansiyometrik titrasyonlar, Orion 940 otomatik titratör (katalog no: S/N 5816) (ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan deiyonize saf su Elga Purelab Classic UV (İngiltere) cihazından elde edilmiştir.

#### Kimyasal maddeler ve çözeltiler

İyonofor olarak ZFNca, polimer matriks olarak PVC; plastikleştirici olarak *o*-nitrofenil oktil eter (*o*-NPOE), dibütil ftalat (DBP), dibütil sebakat (DBS), *o*-nitrofenil pentil eter (*o*-NPPE) ve tris(2-etilhekzil) fosfat (TEHP); iletkenlik arttırıcı olarak sodyum tetrafenilborat (NaTPhB), potasyum tetrakis-(4-klorofenil)borat (KTp(4-ClPh)B) ve sezyum tetrakis-(3-metilfenil)borat (CsTp(3-MePh)B) kullanılmıştır (Sigma/Fluka). Çözücü olarak kullanılan tetrahidrofuran (THF) Merck firmasından temin edilmiştir.

Seçiciliklerin tayininde kullanılan, anyon çözeltileri ilgili anyonların sodyum tuzlarından, katyon çözeltileri ise ilgili katyonların nitrat tuzlarından hazırlanmıştır (Merck/Sigma Aldrich).

pH kalibrasyon çözeltilerini hazırlamak için; borik asit (Merck), asetik asit (Merck) ve fosforik asit (Aldrich) belirli miktarlarda karıştırılarak Britton-Robinson (BR) tampon çözeltileri elde edilmiştir (27). Bu çözeltilerin pH'ları, uygun miktarlarda sodyum hidroksit (Riedel-deHaen) veya hidroklorik asit (Sigma-Aldrich) ilave edilerek ayarlanmıştır. Titrasyonlarda, hidroklorik asit, hidroflorik asit ve fosforik asidin yaklaşık 0.1 M'lık çözeltileri kullanılmıştır.

#### Elektrotların hazırlanması

0.0085 g ZFNca, 0.2935 g *o*-NPOE ve 0.1276 g PVC 5 mL THF içerisinde çözülmüştür. Oluşan homojen karışım, çapı 35 mm olan cam plaka üzerine tutturulmuş cam bir diske dökülmüş ve THF'nin uzaklaşması için yaklaşık 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Oluşan polimerik membranlardan 7 mm'lik bir kısım kesilerek çapı 5 mm, boyu 100 mm olan cam bir borunun ucuna tutturulmuştur. Bu membranın tutturulduğu cam boru, iç dolgu çözeltisi olarak  $1.0 \times 10^{-3}$  M CaCl<sub>2</sub> ile doldurulmuş ve içine AgCl ile kaplanmış gümüş tel (Aldrich) daldırılarak PVC membran pH elektrot hazırlanmıştır (Şekil 2). Elektrotlar kullanılmadan önce saf suda bir gün şartlandırılmıştır.

#### Potansiyometrik ölçümler

Kalibrasyon eğrilerinin çizilmesi ve potansiyometrik titrasyonların gerçekleştirilmesi amacıyla yapılan bütün ölçümler, aşağıdaki elektrokimyasal hücre kullanılarak oda sıcaklığında ( $20 \pm 1$  °C) yapılmıştır.

Referans elektrot || Deney çözeltisi | PVC membran |  $1.0 \times 10^{-3}$  M CaCl<sub>2</sub> | AgCl | Ag BR tamponu içeren çözeltilere uygun miktarlarda NaOH veya HCl eklenerek 1.7-12.8 pH aralığında 50.0 mL'lik bir seri kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Düşük pH'dan başlayarak her bir çözeltinin potansiyeli okunmuş ve hidronyum iyonu derişiminin eksi logaritmasına (pH) karşı grafiğe geçirilmiştir. Çizilen eğrinin doğrusal kısmından çalışma aralığı; bu doğrusal kısmın eğiminden ise, elektrodun eğimi (mV/pH) belirlenmiştir.

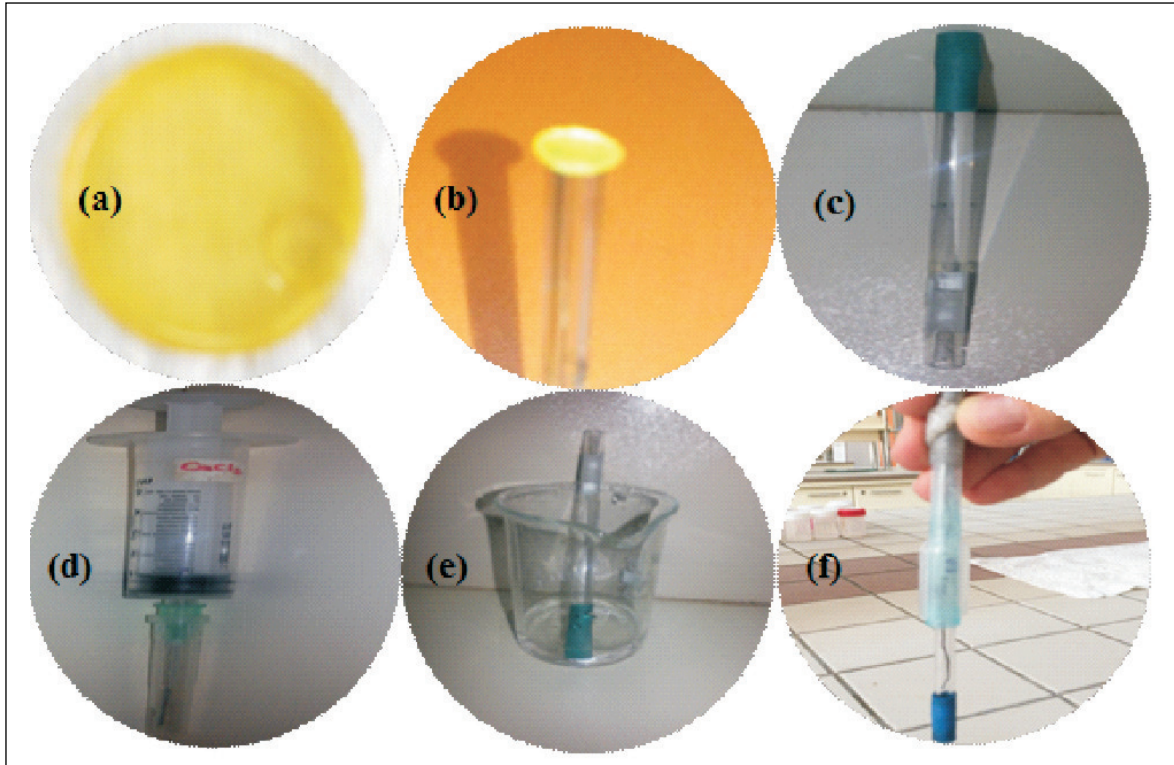
#### Analitik uygulama

Hazırlanan pH elektrot yardımıyla gerçek numunelerde titrasyon asitliğinin tayini için gerekli portakal ve elma suyu, gazlı içecek, bira, kırmızı şarap ve sirke Ankara'daki yerel marketlerden temin edilmiştir. Numunelerin analize hazırlanması ve titrasyon asitliği tayini ulusal/uluslararası standartlarda önerilen şekilde potansiyometrik olarak gerçekleştirilmiştir (38).

### SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### Membran bileşiminin belirlenmesi

Literatürde, iç dolgu çözeltisi PVC membran elektrotların potansiyel cevabına, membran bileşenlerinin türünün ve oranının oldukça etkili



Şekil 2 ZFNca dayanan PVC membran pH elektrotların hazırlanması (a) elde edilen polimerik membran (b) ve (c) kesilen membran parçasının cam bir borunun ucuna tutturulması (d) cam borunun iç dolgu çözeltisi olarak  $1.0 \times 10^{-3}$  M  $CaCl_2$  ile doldurulması (e) elektrodun saf suda şartlandırılması (f) potansiyometrik ölçümlerde kullanılmaya hazır Ag/AgCl içeren elektrot  
*Figure 2 Preparation of ZFNca based PVC membrane pH electrodes (a) the obtained polymeric membrane (b) and (c) attaching the membrane piece to one end of a glass tube (d) filling the glass tube with  $1.0 \times 10^{-3}$  M  $CaCl_2$  as the inner filling solution (e) conditioning the electrode in deionized water (f) the electrode with Ag/AgCl ready for use in potentiometric measurements*

olduğu belirtilmektedir. Bu tip elektrotların hazırlanmasında en sık rastlanan bileşim: %1-7 iyonofor, %28-33 PVC, %60-69 plastikleştirici ve %0.03-3 iletkenlik arttırıcıdır (39). En iyi membran bileşimini belirlemek amacıyla, bu çalışmada plastikleştirici olarak *o*-NPOE'nin kullanıldığı ve ZFNca oranının %0, 1, 2, 3 olacak şekilde değiştirilmesiyle dört farklı elektrot hazırlanmıştır. ZFNca içermeyen elektrodun hidrojen iyonu duyarlılığının düşük olması; ancak, iyonofor içeren elektrotların pH 1.7-9.5 aralığında hidrojen iyonu duyarlılığı göstermesi, ZFNca'nın pH elektrodu hazırlanmasında iyi bir iyonofor olduğu şeklinde değerlendirilmiştir. İyonoforlu üç elektrodun eğimleri karşılaştırıldığında, en yüksek eğim ( $44.1 \pm 1.7$  mV/pH) %2 ZFNca içeren membranla hazırlanan elektrotla gözlenmiştir. Bu nedenle, plastikleştirici ve iletkenlik arttırıcının elektrot cevabı üzerine etkisi incelenirken iyonofor oranı %2'de sabit tutulmuştur.

Plastikleştiriciler, dielektrik sabitlerine bağlı olarak, membrandaki analit iyonlarının hareketliliğini etkileyerek iyon-seçici elektrotların performansını önemli ölçüde değiştirirler (39, 40). Bu çalışmada, plastikleştirici olarak *o*-NPOE yerine, *o*-NPPE, DBP, DBS, TEHP de kullanılarak dört elektrot hazırlanmıştır. Bu elektrotların çalışma pH aralığının 2.3-6.3 olduğu, eğimlerinin ise yaklaşık 7-20 mV/pH aralığında değiştiği görülmüştür. Bu elektrotların hem çalışma aralığı hem de eğim yönünden performansında önemli oranda bir düşüş gözlemlendiğinden, en iyi plastikleştiricinin *o*-NPOE olduğuna karar verilmiştir.

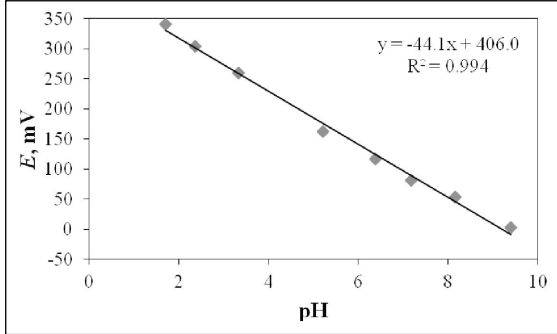
Literatürde yer alan bazı çalışmalarda, PVC esaslı membranlara iletkenlik arttırıcı eklenmesinin, membran direncini düşürerek elektrot özelliklerini geliştirdiği belirtilmektedir (41, 42). Bu amaçla, iyonofora göre mol oranı %70'de sabit tutulan, üç farklı iletkenlik arttırıcının (NaTPhB, *KTp*(4-ClPh)B ve *CsTp*(3-MePh)B) elektrot cevabına etkisi incelenmiştir.



Bu tuzların kullanılmasıyla, elektrot performansının iyileşmediği; aksine eğimlerin düştüğü ve çalışma aralıklarının da daraldığı görülmüştür. Bu durum; iletkenlik arttırıcıdaki katyonların ZFNCA'daki kalsiyum iyonu ile yer değiştirerek moleküle sağlam olarak bağlandığı ve hidrojen iyonlarının membrandaki iyonofora tersinir olarak bağlanabilirliğini engellediği şeklinde yorumlanmıştır. Sonuç olarak, çalışmada hazırlanan pH elektrot membranının optimum bileşimi; %2 ZFNCA, %29.7 PVC, %68.3 o-NPOE olarak bulunmuş ve performans faktörlerinin belirlenmesinde bu membran bileşimine sahip elektrot kullanılmıştır.

### Performans faktörlerinin belirlenmesi

Optimum bileşimde hazırlanan elektrodun, çalışma aralığını belirlemek için 1.7-12.8 pH aralığındaki bir seri BR tamponu çözeltisinden elde edilen potansiyel değerleri, oluşturulan elektrokimyasal hücre kullanılarak okunmuş ve E-pH grafikleri çizilerek Şekil 3'de verilmiştir. Bu grafiğin doğrusal kısmından, pH çalışma aralığı 1.7-9.5 ve eğimi  $44.1 \pm 1.7$  mV/pH olarak bulunmuştur.



Şekil 3 ZFNCA'a dayanan PVC membran pH elektrodun kalibrasyon eğrisi

Figure 3 The calibration graph of the PVC membrane pH electrode based on ZFNCA

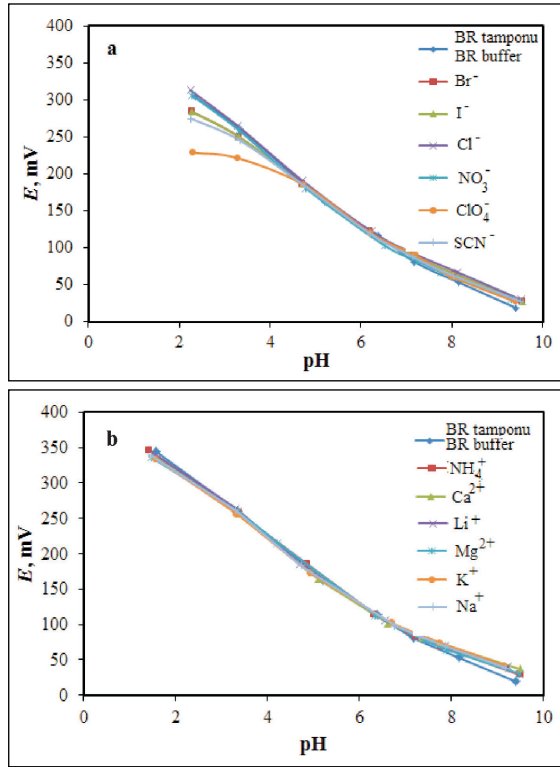
Kalibrasyon çözeltilerine, hazırlanan elektrot ve referans elektrot daldırıldıktan sonra potansiyelin kararlı hale gelmesi için gereken süre elektrodun cevap süresi olup, 15 s olarak belirlenmiştir.

Elektrodun ömrünü belirlemek için, hazırlanan elektrot ile bir yılı aşkın bir süre düzenli aralıklarla kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bu süre içinde çalışma aralığının değişmediği görülmüş ve elektrodun eğimleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Eğimde %20'lik bir düşüşün görüldüğü 12-13 aylık süre elektrodun ömrü olarak değerlendirilmiştir.

Literatürde, makrosiklik bileşiklerin iyonofor olarak kullanılmasıyla hazırlanan elektrotların pek çok anyon ve/veya katyona cevap verdiği belirtilmektedir (13, 23). Bu nedenle, bu çalışmada hazırlanan elektrodun da çeşitli anyon ve katyonlar varlığında potansiyometrik cevabının incelenmesi gerekmektedir. Çünkü bu elektrot kullanılarak toplam asitlik tayininin yapılması düşünülen pek çok içecek, çeşitli anyon ve katyonları önemli derişimlerde içermektedir. Bu amaçla, sabit bozucu yöntemiyle, bazı katyonların ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) ve bazı anyonların ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ) ortamdaki derişimleri;  $1.0 \times 10^{-3}$  M'da sabit tutularak önerilen pH elektroduyla kalibrasyon eğrileri çizilerek, söz konusu iyonların potansiyometrik cevaba etkileri incelenmiştir (Şekil 4). Katyonlar için seçicilik sırası  $\text{Ca}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{K}^+ \sim \text{Na}^+ > \text{NH}_4^+ \sim \text{Mg}^{2+}$  olarak bulunurken, anyonlarda bu sıra  $\text{ClO}_4^- > \text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$  olarak gözlenmiştir. Ancak, katyonların elektrot cevabına önemli bir etkisi olmadığı halde, anyonlardan  $\text{ClO}_4^-$ 'in bozucu etkisinin nispeten yüksek olduğu bulunmuştur. Özellikle, içeceklerde yüksek derişimlerde bulunabilen  $\text{Cl}^-$  gibi bazı iyonların bozucu etkisinin olmadığı ve perklorat iyonunun içeceklerde yüksek derişimlerde bulunmadığı dikkate alındığında, incelenen bu iyonlar varlığında, pek çok gıda numunesinde, önerilen elektrotla pH ve titrasyon asitliği ölçümlerinin yapılabileceği sonucuna varılmıştır.

### Analitik uygulama

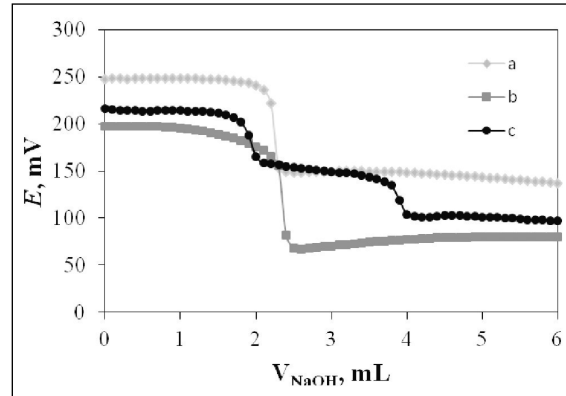
Önerilen elektrodun analitik uygulanabilirliği iki şekilde araştırılmıştır. Bunların ilkinde, elektrot, HCl, HF ve  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 'in ayarlı NaOH ile potansiyometrik titrasyonlarında indikatör pH elektrodu olarak kullanılmıştır. Bunlara ait titrasyon eğrileri Şekil 5'te verilmiştir. Titrasyon eğrilerinden görüldüğü gibi, dönüm noktalarındaki sıçramanın belirgin, ve buradan elde edilen sonuçların kantitatif olması, bu elektrodun asit-baz titrasyonlarında cam elektrot yerine alternatif olarak kullanılabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. İkinci uygulama olarak, çeşitli içeceklerde titrasyon asitliği tayininin yapılabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla, portakal ve elma suyu, gazlı içecek, bira, kırmızı şarap ve sirke numuneleri ulusal/uluslararası standartlarda belirtilen yöntemlere göre hazırlanmış ve indikatör elektrot olarak yeni geliştirilen pH elektrodun kullanılmasıyla ayarlı NaOH ile titre edilmiştir.



Şekil 4 Elektrodun potansiyometrik cevabına çeşitli iyonların etkisi: (a) anyonlar ve (b) katyonlar

Figure 4 The effect of various ions on the potentiometric response of the electrode (a) anions and (b) cations

Beş deneyin ortalamasından elde edilen sonuçlar, cam elektrot kullanılarak elde edilen sonuçlarla birlikte %95 güven seviyesinde ortalama değer  $\pm ts/\sqrt{N}$  olarak Çizelge 1’de verilmiştir. Bulunan değerler  $t$  ve  $F$  testleri uygulanarak istatistik olarak değerlendirilmiştir. Deneysel olarak bulunan  $t_d$  ve  $F_d$  değerlerinin  $t_k$  ve  $F_k$  değerlerinden küçük olması, %95 güven seviyesinde her bir numune için cam elektrot ve önerilen elektrotla elde edilen



Şekil 5. Hazırlanan elektrot kullanılarak ~ 0,1 M asit çözeltilerinin 0.2298 M NaOH ile titrasyonundan elde edilen eğriler: (a) HCl, (b) HF, (c) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Figure 5 The curves obtained from the titration of ~ 0.1 M acid solutions with 0.2298 M NaOH by using the prepared electrode, (a) HCl, (b) HF, (c) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

sonuçlar arasında doğruluklar ve kesinlikler açısından anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Bütün bu verilerden, önerilen PVC membran pH elektrodun, çeşitli içeceklerin titrasyon asitliklerinin potansiyometrik tayininde, cam elektrot yerine başarılı bir şekilde kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Literatürdeki eşdeğerleriyle karşılaştırıldığında, ZFNca kullanılarak hazırlanan PVC membran pH elektrodun, yüksek seçicilik özellikleri ve uzun ömrü açısından üstün (10, 12, 20, 22, 24, 25, 30-, 32); tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik açısından ise yanşabilir nitelikte olduğu görülmüştür (6, 7, 11, 34). Önerilen elektrodun hazırlanmasında iyonofor olarak kullanılan ZFNca’nın biyoyumlu olması, kalite kontroller sırasında, gıda numunelerinde doğrudan pH ölçümü için bu elektrodun kullanılabilir nitelikte olduğunu düşündürmüştür.

Çizelge 1 Önerilen pH elektrot ve geleneksel cam elektrot kullanılarak, bazı içeceklerin titrasyon asitliklerinin tayininden elde edilen sonuçlar (% 95 güven seviyesi,  $N=5$ ,  $t_{kritik}= 2.78$ ,  $F_{kritik}=6.39$ )

Table 1 The results obtained from the determination of the titratable acidity of some beverages using the proposed pH electrode and the conventional glass electrode (95% confidence level,  $N=5$ ,  $t_{critical} = 2.78$ ,  $F_{critical} =6.39$ )

Numune Sample	Cam elektrot Glass electrode		Önerilen elektrot Proposed electrode	
	Titrasyon asitliği Titratable acidity	Titrasyon asitliği Titratable acidity	$t_{deneyisel}$ $t_{experimental}$	$F_{deneyisel}$ $F_{experimental}$
Portakal suyu Orange juice	13.3±0.6	12.6±1.3	1.23	0.15
Elma suyu Apple juice	9.8±0.3	9.4±0.3	1.81	0.81
Gazlı içecek Fizzy drink	0.6±0.0	0.6±0.0	1.15	0.70
Bira Beer	0.6±0.1	0.6±0.0	0.86	0.68
Şarap Wine	8.4±0.2	8.0±0.5	1.84	0.22
Sirke Vinegar	85.3±4.3	83.1±1.6	1.23	0.08

**TEŞEKKÜR**

Bu çalışma Ankara Üniversitesi BAP tarafından desteklenmektedir. (Proje No: 10B4240003)

**KAYNAKLAR**

1. Cemeroglu B.S (ed). 2013. *Gıda Analizleri*. Bizim Grup Basımevi Ajans Tan. Org. Yay. Dağ.San. Tic. Ltd. Şti. Ankara, Türkiye, 475 s.
2. Crespo G.A., Afshar M.G., Bakker E. 2012. Direct Detection of Acidity, Alkalinity, and pH with Membrane. *Anal. Chem.*, 84, 10165-10169.
3. Tayfur M (ed). 2014. *Gıda Katkı Maddeleri*. Detay Yayıncılık Ankara, Türkiye, 230 s.
4. Ansari R., Arvand M., Heydari L. 2014. The behaviour of polyaniline-coated PVC membrane based on 7,16-didecyl-1, 4, 10, 13-tetraoxa-7, 16-diazacyclooctadecane for pH measurements in highly acidic media. *J. Chem. Sci.*, 126, 41-48.
5. Peng L.B., Heng L.Y., Hasbullah S.A., Ahmad M. 2007. A solid-state pH transducer fabricated from a self-plasticized methacrylic-acrylic membrane for potentiometric acetylcholine chloride biosensor. *J. Anal. Chem.*, 62, 884-888.
6. Kim B., Shim J., Chung K.C. 2011. Study on hydrogen ion-selective solid contact electrodes based on decamethylcyclopentasiloxane, *Anal. Lett.*, 44, 2138-2149.
7. Crespo G.A., Gugsá D., Macho S., Rius F. X. 2009. Solid-contact pH-selective electrode using multi-walled carbon nanotubes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395, 2371-2376.
8. Michalska A., Hulanicki A., Lewenstam A. 1994. All solid-state hydrogen ion-selective electrode based on a conducting poly(pyrrole) solid contact. *Analyst*, 119, 2417-2420.
9. Faria R.C., Bulhões L.O.S. 1998. Hydrogen ion selective electrode based on poly(1-aminoanthracene) film. *Anal. Chim. Acta*, 377, 21-27.
10. Zine N., Bausells J., Ivorra A., Aguiló J., Zabala M., Teixidor F., Masalles C., Viñas C., Errachid A. 2003. Hydrogen-selective microelectrodes based on silicon needles. *Sensor Actuat B*, 91, 76-82.
11. Han W.S., Chung K.C., Kim M.H., Ko H.B., Lee Y.H., Hong T.K. 2004. A hydrogen ion-selective poly(aniline) solid contact electrode based on dibenzylpyrenemethylamine ionophore for highly acidic solutions, *Anal. Sci.*, 20, 1419-1422.
12. Han W.S., Park M.Y., Chung K.C., Cho K.C., Hong T.K. 2001. All solid state hydrogen ion selective electrode based on a tribenzylamine neutral carrier in a poly(vinyl chloride) membrane with a poly(aniline) solid contact. *Electroanal.*, 13, 955-959.
13. Han W.S., Park M.Y., Chung K.C., Cho K.C., Hong T.K., 2001. Potentiometric sensor for hydrogen ion based on N,N'-dialkylbenzylethylenediamine neutral carrier in a poly(vinyl chloride) membrane with polyaniline solid contact. *Talanta*, 54, 153-159.
14. Alexander P.W., Dimitrakopoulos T., Hibbert D.B. 1997. Photo-cured ammonium and hydrogen ion selective coated-wire electrodes used simultaneously in a portable battery-powered flow injection analyzer. *Electroanal.*, 9, 1331-1336.
15. Ahn J.H., Kim J.Y., Seol M.L., Baek D.J., Guo Z., Kim C.H., Choi S.J., Choi Y.K. 2013. A pH sensor with a double-gate silicon nanowire field-effect transistor, *Appl. Phys. Lett.*, 102, 1-5.
16. Chien Y.S., Tsai W.L., Lee I.C., Chou J.C., Cheng H.C. 2012. A novel pH sensor of extended-gate field-effect transistors with laser-irradiated carbon-nanotube network, *IEEE Electron Device Lett.*, 33, 1622-1624.
17. Kashif M., Ali M.E., Ali S.M.U., Hashim U., Hamid S.B.A. 2013. Impact of hydrogen concentrations on the impedance spectroscopic behavior of Pd-sensitized ZnO nanorods, *Nanoscale Res. Lett.*, 8, 68-77.
18. Zakharova G.S., Podval'naya N.V. 2013. Bifunctional potentiometric sensor based on MoO<sub>3</sub> nanorods. *J. Anal. Chem.*, 68, 50-56.
19. Lutov V.M., Mikhelson K.N. 1994. A new pH sensor with a PVC membrane: analytical evaluation and mechanistic aspects. *Sensor Actuat B*, 18, 400-403.
20. Arvand M., Ghaiuri K. 2009. Batch and flow measurement of hydrogen ions in highly acidic media using 2-(4-methoxy phenyl) 6-(4-nitrophenyl)-4-phenyl-1,3-diazabicyclo [3.1.0] hex-3-ene as an H<sup>+</sup>-selective ionophore. *Talanta*, 79, 863-870.
21. Chojnacki J., Biernat J.F. 1990. Application of azoles as neutral carriers in liquid membrane ion-selective pH electrodes. *J Electroanal Chem*, 277, 159-164.



22. Nurminen K., Outinen-Y L., Narkilahti S., Lekkala J. 2010. A capillary pH electrode for evaluating long term culturing of neural cell populations. *Procedia Engineering*, 5, 544-547.
23. Cho D.H., Chung K.C., Jeong S.S., Park M.Y. 2000. Potentiometric behavior of *N,N,N',N'*-tetrabenzylmethylenediamine-based hydrogen ion-selective electrodes. *Talanta*, 51, 761-767.
24. Cho D.H., Chung K.C., Park M.Y. 1998. Hydrogen ion-selective membrane electrodes based on alkylidibenzylamines as neutral carriers, *Talanta*, 47, 815-821.
25. Joung K.I., Yoon H.J., Nam H., Paeng K.J. 2001. Development of pH sensor based on aromatic polyurethane matrix. *Microchem. J.*, 68, 115-120.
26. Crespo G.A., Afshar M.G., Bakker E. 2012. Direct detection of acidity, alkalinity, and pH with membrane electrodes. *Anal. Chem.*, 84, 10165-10169.
27. Lindner E., Cosofret V.V., Kusy R.P., Buck R.P. 1993. Responses of H<sup>+</sup> selective solvent polymeric membrane electrodes fabricated from modified PVC membranes. *Talanta*, 40, 957-967.
28. Langmaier J., Lindner E. 2005. Detrimental changes in the composition of hydrogen ion-selective electrode and optode membranes. *Anal. Chim. Acta*, 543, 156-176.
29. Kothur R.R., Hall J., Patel B.A., Leong C.L., Boutelle M.G., Cragg P.J. 2014. A low pH sensor from an esterified pillar[5]arene. *Chem. Commun.*, 50, 852-854.
30. Liu X.J., Peng B., Liu F., Qin Y. 2007. Potentiometric liquid membrane pH sensors based on calix[4]-aza-crowns. *Sensor Actuat B*, 125, 656-663.
31. Kuruoğlu D., Canel E., Memon S., Yılmaz M., Kılıç E. 2003. Hydrogen ion-selective poly (vinyl chloride) membrane electrode based on calix[4]arene. *Anal. Sci.*, 19, 217-221.
32. Demirel, A., Doğan, A., Canel, E., Memon, S., Yılmaz, M., Kılıç, E. 2004. Hydrogen ion-selective poly(vinyl chloride) membrane electrode based on a p-tert-butylcalix[4]arene-oxacrown-4. *Talanta*, 62, 123-129.
33. Kormalı Ertürün H. E., Demirel Özel A., Sayın S., Yılmaz M., Kılıç E. 2015. Development of a pH sensing membrane electrode based on a new calix[4]arene derivative. *Talanta*, 132, 669-675.
34. Ping J., Wang Y., Wu J., Ying Y., Ji F. 2012. A novel pH sensing membrane based on an ionic liquid-polymer composite. *Microchim. Acta*, 176, 229-234.
35. Ansari R., Arvand M., Heydari L. 2014. The behaviour of polyaniline-coated PVC membrane based on 7,16-didecyl-1, 4, 10, 13-tetraoxa-7, 16-diazacyclooctadecane for pH measurements in highly acidic media. *J. Chem. Sci.*, 126, 41-48.
36. Michalak, M., Kurel M.; Jedraszko J., Toczydlowska D., Wittstock G., Opallo M., Nogala W. 2015. Voltammetric pH Nanosensor. *Anal. Chem.*, 87 (23), 11641-11645.
37. Taşdemir, İ.H., Kılıç, E. 2014. Reduction Pathways of Zofenopril Based on Experimental and Computational Approach and its Voltammetric Determination. *Int. J. Electrochem. Sci.*, 9, 1758-1770.
38. Anon 2002. Meyve ve Sebze Ürünleri Titre Edilebilir Asitlik Tayini, TS 1125 ISO 750. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
39. Zolotov, Y. A. 1997. *Macrocyclic Compounds in Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons Ltd., USA, 448s.
40. Choi Y.W., Minoura N., Moon S.H. 2005. Potentiometric Cr(VI)-Selective Electrode Based on Novel Ionophore-Immobilized PVC Membranes. *Talanta*, 66, 1254-1263.
41. Schaller U., Bakker E., Spichiger E., Pretsch E. 1994. Ionic additives for ion-selective electrodes based on electrically charged carriers. *Anal. Chem.*, 66, 391-398.
42. Eugster R., Gehrig P.M., Morf W.E., Spichiger U.E., Simon W. 1991. Selectivity-modifying influence of anionic sites in neutral carrier-based membrane electrodes. *Anal. Chem.*, 63, 2285-2289.

## TARA, TRAGAKANT VE AGAR AGAR GAMLARININ TAVUK KÖFTELERDE KULLANIMI

Osman Kılınççeker\*

Adıyaman Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Kampüs, Adıyaman

Geliş tarihi / Received: 27.07.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 20.10.2016

Kabul tarihi / Accepted: 17.12.2016

### Öz

Bu çalışmada farklı gamların ve konsantrasyonlarının çiğ ve kızarmış tavuk köftelere etkisini belirlemek amaçlanmıştır. Köfteler tara, tragakant ve agar agar gamlarını % 0.5, % 1 ve % 1.5 oranında içerecek şekilde hazırlanmıştır. Çiğ örneklerde 10 gün soğukta depolama ile pH, TBA ve renk değerlerindeki değişimler belirlenmiştir. Kızarmış örneklerde ise bazı fiziksel, teknolojik ve duyuşsal nitelikler belirlenmiştir. Sonuç olarak, gam ilavesi ile çiğ örneklerin depolama esnasında pH ve TBA değerlerindeki artış yavaşlatılırken, renk değerlerinin iyileştirilebileceği gözlenmiştir. Kızarmış örneklerde ise renk değerlerinin geliştirilebileceği, verim, nem tutma oranı ve duyuşsal puanların artırılabilceği anlaşılmıştır. Ayrıca kızartma süresince çap küçülmesi ve yağ emilim miktarlarının da azaltılabileceği gözlenmiştir. Bütün sonuçlara bağlı olarak tavuk köfte hazırlamada en avantajlı muamelelerin agar agar gamının % 1 ve % 1.5 seviyelerinin olduğu anlaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Tavuk köfte, tara gamı, tragakant gamı, agar agar gamı, kızartma

## THE USE OF TARA, TRAGAKANT AND AGAR AGAR GUMS IN CHICKEN MEATBALLS

### Abstract

The aim of this study was to determine the effects of treatments with different gums and gum concentrations on raw and fried chicken meatballs. Meatballs were prepared with three different formulations (0.5, 1 and 1.5%) for each of tara, tragacanth and agar agar gums. The pH, TBA, and colour values of raw samples were determined during cold storage for ten days. Also, some physical, technological, and sensory properties of fried meatballs were evaluated. Consequently, it observed that increasing of pH and TBA during storage can be slowed and colour values can be improved with using of gums. It understand that colour values, yield, moisture retention, and sensory scores of fried meatballs can be increased. In addition, diameter reductions and fat absorption of fried samples also decreased during frying. According to results, most advantageous treatments for chicken meatballs were 1% and 1.5% levels of agar agar.

**Keywords:** Chicken meatballs, tara gum, tragacanth gum, agar agar gum, frying

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ okilinceker@adiyaman.edu.tr, © (+90) 416 2233800/1290,

☎ (+90) 416 223 2129

## GİRİŞ

Gıda sektöründe yeni üretim teknikleri ürünlerdeki bazı problemleri çözmek ve üretim esnasında uygulanan işlemleri kolaylaştırmak amacıyla gittikçe yaygınlaşmaktadır. Özellikle hazır gıdaların hayatımızda daha fazla yer almaya başlaması ile şeker, obezite ve kalp-damar hastalıklarının yaygınlaşması gıdalarda bulunan kaloriyi düşürme çalışmalarını artırmıştır. Ayrıca tüketicilere daha kaliteli ürünler sunmak için en uygun katkı maddelerinin ve miktarlarının seçimi de bu çalışmalara konu olarak sektördeki uygulamalara yön vermiştir (1-4).

Et endüstrisindeki en önemli uygulamaların bazıları üründe bulunan yağ içeriğini azaltma, tekstürü, görünüşü ve rengi iyileştirme ile ilgili çalışmalardır. Ayrıca pişirme kayıplarını azaltma ile ilgili uygulamalarda örnek olarak verilebilir (5-8).

Bahsedilen çalışmaların sonuçları beyaz et ve ürünlerinde et tabiatında olmayan birçok fonksiyonel bileşiğin kullanılabilmesini işaret etmektedir. Çeşitli koruyucular, renk maddeleri, bitkisel lifler gibi birçok madde farklı nitelikleri üründe iyileştirmek için kullanılabilirken, en önemli gruptan bir tanesi de gamlardır. Gamlar genel olarak yüksek oranda su bağlama yeteneği olan, renksiz, kokusuz ve tatsız bileşiklerdir. Çok düşük miktarlarda dahi kullanıldıklarında çiğ ve pişmiş ürünlerin viskozitesini, tekstürünü ve dokusunu etkileyebilirler. Çeşitli pişirme uygulamalarında nem kaybını azaltabildikleri için dolaylı olarak ürünün rengini, şeklini ve tadını da etkileyebilirler. Ayrıca alerjik olmamaları ve dondurma işlemi gibi çeşitli proseslere dayanıklı olmaları diğer bazı avantajlarıdır (9-14).

Bahsedilen özelliklerinden dolayı çeşitli gamların tavuk köftelerde kullanımı ile bu tarz ürünlerde çiğ olarak depolamada görülebilen renk değişimi, oksidasyon, pişmiş üründe ortaya çıkan ağırlık kaybı ve çap azalması gibi hataların azaltılabileceği, tekstürün iyileştirilebileceği anlaşılmaktadır. Hatta kızartma esnasında rengin iyileştirilebileceği, nem kaybı ve yağ emiliminin azaltılarak, kalori değerinin azaltılabileceği düşünülmektedir. Ancak yapılan literatür araştırmaları sonucunda tavuk eti ürünlerinde gam kullanımı ile ilgili verilerin çok az olduğu anlaşıldığından bu çalışmada tara, trakagant ve agar agar gamlarının farklı oranlarda tavuk köftelerde kullanım olanakları ortaya koyulmuştur.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırmada kullanılan tara, tragakant ve agar agar gamları Smart Kimya (İzmir)'dan satın alınmıştır. Tavuk göğüs etleri ve diğer katkı maddeleri Adıyaman'da yerel marketlerden temin edilmiştir. Kızartma yağı olarak ay çiçek yağı (Yudum), kızartma makinası olarak 1 lt hacime sahip Tefal marka bir mini kızartıcı kullanılmıştır.

Çalışma esnasında donmuş tavuk göğüs etleri 16-18 saat boyunca +4 °C'de çözündürülmüştür. Çözünen etleri kıyma işleminden sonra, 9650 g kıyılmış et, 150 g tuz, 100 g karabiber ve 100 g sıvı ay çiçek yağı içerecek şekilde ön karışım hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışımdan bir miktar alınıp, % 0.5, % 1 ve % 1.5 oranında tara, tragakant ve agar agar gamlarından ilave edilerek asıl örnekler hazırlanmıştır. Örnekler iyice yoğurulup 30 d 4 °C de bekletildikten sonra, her bir örnek için eşit ağırlıkta (20 g) ve çapta yuvarlak köfteler hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir örnek iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup ile çiğ örneklerde depolama stabilitesi ile ilgili analizler yapılırken, ikinci grup kızartma öncesinde ve 180 °C'de 5 d kızartma sonrasında bazı analizlere tutulmuştur.

## pH ve TBA değerlerinin belirlenmesi

Depolanan çiğ örneklerin pH ölçümleri bir pH metre (Orion 3-star, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. 10 g örnek 100 mL saf suda homojen çözünene kadar 5 d karıştırıldıktan sonra ölçüm yapılmıştır (15). Oksidasyon seviyesi hakkında fikir edinmek için yapılan TBA analizi Tarladgis ve arkadaşları (16)'na göre yapılmıştır. Bu amaçla; bir behere 10 g örnek koyulmuş, üzerine 50 mL saf su ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra 47.5 mL su ile beraber Kjeldahl balonuna aktarılmıştır. Üzerine 2.5 ml 4 N'lik HCL ve 1-2 damla silikon yağı ilave edildikten sonra distilasyon ünitesine bağlanmıştır. Yaklaşık 50 ml distilat elde edildikten sonra bu distilatlardan 5 mL alınıp cam tüplere aktarılmış, üzerine 5 mL TBA reaktifi ilave edilmiş ve 35 d kaynar suda bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutma işlemi sonrası 538 nm dalga boyuna ayarlı spektrofotometrede (UV-160 A, Shimadzu, Tokyo, Japonya) köre karşı absorbanları okunmuştur. Okunan değerler 7.8 ile çarpılmış ve TBA sonuçları mg malonaldehit/kg örnek olarak ifade edilmiştir.

### Renk analizleri

Renk ölçümleri çiğ ve kızarmış köftelerin yüzeyinde kolorimetre (Minolta CR-400, Osaka, Japan) kullanımı ile yapılmıştır. Ölçümler öncesi cihaz standart olarak kalibre edilmiştir. Renk değerleri CIELAB sistemine göre *L* (açıklık-koyuluk), *a* (kırmızılık-yeşillik) ve *b* (sarılık-mavilik) değerleri şeklinde ifade edilmiştir.

### Kızartma verimi ve çap azalmasının belirlenmesi

Köftelerin kızartma sonrası verim ve çaplarındaki azalma oranları yapılan ağırlık ve çap ölçümleri sonrası aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

1. Kızartma verimi (%) =  $\frac{\text{Kızarmış köfte ağırlığı}}{\text{Çiğ köfte ağırlığı}} \times 100$
2. Çap azalması (%) =  $\frac{\text{Çiğ köfte çapı} - \text{Kızarmış köfte çapı}}{\text{Çiğ köfte çapı}} \times 100$

### Nem tutma ve yağ emilim değerlerinin belirlenmesi

Çiğ ve kızarmış köftelerin nem tayini  $105 \pm 2$  °C'de etüvde kurutma, yağ tayini ise hegzan kullanarak Soxhelet ekstraksiyon yöntemi ile yapılmıştır (17). Nem tutma ve yağ emilim değerleri ise aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

1. Nem tutma (%) =  $\frac{\text{Kızarmış köftenin nemi} (\%)}{\text{Çiğ köftenin nemi} (\%)} \times \text{Kızartma verimi}$
2. Yağ emilimi (%) = Kızarmış köftenin yağı (%) - Çiğ köftenin yağı (%)

### Duyusal analizler

Duyusal analizler için Gıda İşleme Bölümü öğrencisi olan 10 adet panelist kullanılmıştır. Panelistlere puanlama öncesinde kısa bir eğitim verilmiştir. Analizler hoşlanma derecesine bağlı olarak puanlamanın yapıldığı hedonik skalaya göre gerçekleştirilmiştir. Puanlar ve karşılıkları; 1: aşırı hoş olmayan, 2: çok fazla hoş olmayan, 3: orta derecede hoş olmayan, 4: hafif hoş olmayan, 5: nötr, 6: hafif hoş olan, 7: orta derece hoş olan, 8: çok fazla hoş olan, 9: aşırı hoş olan şeklinde belirtilmiştir (18).<

### İstatistik analizleri

Çalışma iki tekerrür ve üç paralel olarak yürütülmüştür. Elde edilen verilere varyans analizi uygulanmış, önemli bulunan faktör ortalamaları  $P < 0.01$  ve  $P < 0.05$  düzeyinde Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur (SPSS, CHICAGO, IL, USA).

### SONUÇ VE TARTIŞMA

#### Çiğ köftelerin pH, TBA ve renk değerleri

Depolama esnasında enzimatik ve mikrobiyolojik faaliyetler et ürünlerinde azotlu bileşiklerin yıkımına sebep olur. Oluşan amonyak gibi bozulma ürünleri pH değerini yükseltir. Oksidasyon ise yağ asitlerinde meydana gelen bir bozulmadır. Özellikle uzun süre depolanan et gibi yağlı ürünlerde, aldehit ve keton gibi oksidasyon ürünleri, raf ömrünü belirleyen en önemli etkenlerden bazılarıdır. Hem pH'nın hem de TBA değerinin artması ürün kalitesinin düştüğünü gösteren bir işarettir (3, 4, 18). Çalışmada yapılan depolama dönemleri sonrasındaki pH ve TBA değerleri çizelge 1'de gösterilmiştir. Çizelgeye bakıldığında; pH ve TBA değerleri üzerinde gam türü, gam konsantrasyonu ve depolamanın etkili olduğu anlaşılabılır. İlk gün genel olarak bütün örnekler kontrol örneğinden daha yüksek pH değerine sahip olurken, son depolama gününde özellikle agar agar içeren köftelerin kontrolden ve diğer örneklerden daha düşük pH'ya sahip oldukları anlaşılmıştır. Gam miktarının artışı pH değerlerinde düzensiz bir değişime sebep olmuştur. Fakat depolama sürelerinin artışı pH değerlerini artırmıştır. 10. gün değerlerine bakıldığında, en düşük pH değerleri 6.20 ve 6.21 olarak agar agar gamı içeren bütün örneklerde ölçülmüştür. Çalışmamıza benzer şekilde; Can (19) tavuk köftelere farklı oranlarda kekik yağı katıp soğuk depoda 12 gün depoladığında pH değerinin 5.9-6.4 arasında olduğunu gözlemiştir. Sanchez-Zapata ve arkadaşları (20) domuz eti ve ceviz lifinden hazırladıkları burgerlerde pH değerinin 6.16-6.20 aralığında olduğunu ve lif eklemin etkisinin önemsiz olduğunu belirlemişlerdir. Demirci ve arkadaşları (2) farklı gamlar ile yaptıkları çalışmada, çiğ ve pişmiş sığır eti köftelerindeki pH değerlerini 6.7-6.9 aralığında belirlemişlerdir. Soltanzadeh ve Ghiasi-Esfehani (21) ise % 0, 1, 3 ve 5 oranında Aloe vera içeren sığır eti köftelerinin +4 °C'de 7 gün depolanması sonucunda % 1 ve % 3 Aloe vera ilave etmenin pH değerini azalttığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar bahsedilenlerle benzerlik gösterirken, bütün örnekler için pH değerlerinin et ve ürünlerinde Gökalp ve arkadaşları (18) tarafından tüketim sınırı olarak verilen pH=6.5 değerini aşmadıkları gözlenmiştir.

Çizelge 1. Gam tipi ve konsantrasyonunun farklı depolama sürelerinde çiğ örneklerin pH, TBA ve renk değerleri üzerine etkileri  
Table 1. Effects of gum type and concentration on pH, TBA and color values of raw samples at different storage periods

	Gam tipi Gum type	1. gün 1 <sup>st</sup> day				5. gün 5 <sup>th</sup> day				10. gün 10 <sup>th</sup> day			
		Gam konsantrasyonu Gum concentration				Gam konsantrasyonu Gum concentration				Gam konsantrasyonu Gum concentration			
		Kontrol (%0) Control (0%)	%0.5 0.5%	%1 1%	%1.5 1.5%	Kontrol (%0) Control (0%)	%0.5 0.5%	%1 1%	%1.5 1.5%	Kontrol (%0) Control (0%)	%0.5 0.5%	%1 1%	%1.5 1.5%
pH	Tara	6.12 <sup>aAZ</sup>	6.16 <sup>aAY</sup>	6.16 <sup>aAY</sup>	6.12 <sup>bAY</sup>	6.19 <sup>aAY</sup>	6.19 <sup>aAY</sup>	6.21 <sup>bAY</sup>	6.22 <sup>bAY</sup>	6.28 <sup>aAX</sup>	6.29 <sup>aAX</sup>	6.28 <sup>aAX</sup>	6.27 <sup>aAX</sup>
	Tragakant	6.12 <sup>abZ</sup>	6.16 <sup>aAZ</sup>	6.15 <sup>aAY</sup>	6.13 <sup>bABY</sup>	6.19 <sup>cY</sup>	6.22 <sup>bBY</sup>	6.25 <sup>aAX</sup>	6.24 <sup>aABX</sup>	6.28 <sup>aAX</sup>	6.26 <sup>abAX</sup>	6.25 <sup>aAX</sup>	6.24 <sup>abAX</sup>
	Agar agar	6.12 <sup>abZ</sup>	6.16 <sup>aAZ</sup>	6.15 <sup>aABY</sup>	6.16 <sup>aAY</sup>	6.19 <sup>bBY</sup>	6.25 <sup>aAX</sup>	6.23 <sup>abABX</sup>	6.24 <sup>aAX</sup>	6.28 <sup>aAX</sup>	6.21 <sup>bBY</sup>	6.20 <sup>bBX</sup>	6.21 <sup>bBXY</sup>
TBA mg/kg	Tara	0.26 <sup>aAX</sup>	0.23 <sup>abY</sup>	0.22 <sup>bBY</sup>	0.20 <sup>bBY</sup>	0.30 <sup>bBX</sup>	0.32 <sup>bBX</sup>	0.33 <sup>aXY</sup>	0.31 <sup>bABX</sup>	0.27 <sup>aABX</sup>	0.25 <sup>aBY</sup>	0.36 <sup>aAX</sup>	0.22 <sup>bBY</sup>
	Tragakant	0.26 <sup>aAX</sup>	0.24 <sup>aBY</sup>	0.21 <sup>abZ</sup>	0.23 <sup>aBY</sup>	0.30 <sup>bBX</sup>	0.32 <sup>bBX</sup>	0.33 <sup>aAX</sup>	0.37 <sup>aAX</sup>	0.27 <sup>aAX</sup>	0.26 <sup>aAY</sup>	0.23 <sup>aBY</sup>	0.25 <sup>bAY</sup>
	Agar agar	0.26 <sup>aAX</sup>	0.21 <sup>abY</sup>	0.24 <sup>aBY</sup>	0.23 <sup>abAZ</sup>	0.30 <sup>aAX</sup>	0.35 <sup>aAX</sup>	0.34 <sup>aAX</sup>	0.32 <sup>aAX</sup>	0.27 <sup>aAX</sup>	0.25 <sup>aAY</sup>	0.25 <sup>aAXY</sup>	0.28 <sup>aBY</sup>
L	Tara	47.98 <sup>aAX</sup>	47.80 <sup>aAX</sup>	43.93 <sup>bAX</sup>	47.39 <sup>aAX</sup>	44.64 <sup>bAX</sup>	46.87 <sup>aAX</sup>	45.93 <sup>bABX</sup>	45.60 <sup>aABX</sup>	44.55 <sup>aAX</sup>	47.34 <sup>aAX</sup>	45.08 <sup>aAX</sup>	44.16 <sup>aAX</sup>
	Tragakant	47.98 <sup>aAX</sup>	46.00 <sup>aAX</sup>	46.24 <sup>abAX</sup>	47.01 <sup>aAX</sup>	44.64 <sup>bAX</sup>	46.48 <sup>aAX</sup>	46.90 <sup>abAX</sup>	47.58 <sup>aAX</sup>	44.55 <sup>aAX</sup>	48.49 <sup>aAX</sup>	46.72 <sup>aAX</sup>	45.32 <sup>aAX</sup>
	Agar agar	47.98 <sup>aAX</sup>	48.03 <sup>aAX</sup>	49.98 <sup>aAX</sup>	49.26 <sup>aAX</sup>	44.64 <sup>bAX</sup>	47.32 <sup>abAX</sup>	48.40 <sup>aABX</sup>	48.48 <sup>aAX</sup>	44.55 <sup>bBX</sup>	47.07 <sup>abAX</sup>	47.91 <sup>aAX</sup>	48.13 <sup>aAX</sup>
a	Tara	2.84 <sup>aAX</sup>	3.09 <sup>aAX</sup>	2.52 <sup>aAX</sup>	2.68 <sup>aAX</sup>	1.92 <sup>aAX</sup>	2.44 <sup>aXY</sup>	2.33 <sup>aAX</sup>	2.05 <sup>bAY</sup>	1.51 <sup>aAX</sup>	1.68 <sup>aAY</sup>	1.58 <sup>bAX</sup>	1.56 <sup>aAZ</sup>
	Tragakant	2.84 <sup>aAX</sup>	2.55 <sup>aAX</sup>	3.21 <sup>aAX</sup>	1.95 <sup>aAX</sup>	1.92 <sup>bBX</sup>	1.87 <sup>bBY</sup>	2.33 <sup>aAX</sup>	2.24 <sup>aAX</sup>	1.51 <sup>aAX</sup>	1.94 <sup>aAY</sup>	1.90 <sup>aAX</sup>	1.60 <sup>aAX</sup>
	Agar agar	2.84 <sup>aAX</sup>	2.59 <sup>aAX</sup>	3.16 <sup>aAX</sup>	2.90 <sup>aAX</sup>	1.92 <sup>bBX</sup>	2.43 <sup>aAX</sup>	2.47 <sup>aXY</sup>	2.64 <sup>aAX</sup>	1.51 <sup>aAX</sup>	1.88 <sup>bAX</sup>	1.88 <sup>aAY</sup>	2.05 <sup>aAY</sup>
b	Tara	11.33 <sup>aAX</sup>	11.84 <sup>aAX</sup>	10.26 <sup>bAX</sup>	11.46 <sup>abAX</sup>	10.30 <sup>bBX</sup>	11.58 <sup>aAX</sup>	11.46 <sup>abAX</sup>	11.08 <sup>bABX</sup>	10.66 <sup>aAX</sup>	11.95 <sup>aAX</sup>	11.26 <sup>aAX</sup>	11.07 <sup>aAX</sup>
	Tragakant	11.33 <sup>aAX</sup>	10.49 <sup>aAY</sup>	11.30 <sup>abAX</sup>	10.16 <sup>abAX</sup>	10.30 <sup>cX</sup>	11.03 <sup>bBY</sup>	11.71 <sup>aAX</sup>	11.60 <sup>bAX</sup>	10.66 <sup>aAX</sup>	12.54 <sup>aAX</sup>	12.30 <sup>abAX</sup>	11.49 <sup>aAX</sup>
	Agar agar	11.33 <sup>aAX</sup>	11.27 <sup>aAX</sup>	12.56 <sup>aAX</sup>	12.68 <sup>aAX</sup>	10.30 <sup>bBX</sup>	12.01 <sup>aABX</sup>	12.55 <sup>aAX</sup>	12.74 <sup>aAX</sup>	10.66 <sup>aBX</sup>	12.03 <sup>aABX</sup>	12.47 <sup>aABX</sup>	12.83 <sup>aAX</sup>

<sup>ac</sup> Her bir sütun içerisinde, her bir konsantrasyon için gamlar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>Ac</sup> Her bir satır içerisinde, her bir depolama süresi için, gam konsantrasyonları arası farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>xZ</sup> Her bir satır içerisinde, her bir gam konsantrasyonunun depolamaya bağlı farklılığını göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>ac</sup> Within each column, different superscript lowercase letters show differences between the gum types within each concentration ( $p < 0.05$ ).

<sup>Ac</sup> Within each row, different superscript uppercase letters show differences between the gum concentrations within each storage period ( $p < 0.05$ ).

<sup>xZ</sup> Within each row, different superscript uppercase letters show differences between the storage periods with respect to same gum type and concentration ( $p < 0.05$ ).

Gamların TBA değerleri üzerindeki etkisi 1. günde önemsiz çıkarken, 10. gün sonunda tara gamı ve tragakant gamının % 1.5 kullanıldığında avantajlı olabileceği gözlenmiştir. Gam konsantrasyonunun artışı, ilk gün, gam içeren örneklerin TBA değerlerini kontrole göre düşürmüştü, ancak 10. gün sonrasında TBA sayılarının düzensiz bir şekilde değişimine sebep olmuştur. Depolama sürelerinin etkisine bakıldığında çoğunlukla 5. gün sonunda TBA değerleri yükseliş gösterirken, 10. gün sonunda tekrar düşükleri anlaşılmıştır. 10 gün sonraki TBA sayılarında en düşük değer 0.22 mg/kg olarak % 1.5 tara gamı içeren köftede olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde Can (19) kekik yağı ile farklı oranlarda hazırladığı tavuk köfteleri soğukta depoladığında TBA değerinin 0.3-0.9 mg/kg aralığında değiştiğini belirlemiştir. Cava ve arkadaşları (22) domates lifi ve pancar lifi ilave ederek hazırladıkları tavuk ürünlerinde lif ilavesinin TBA değerlerini azalttığını bulmuşlardır. +4 °C'de 10 gün depoladıkları ürünlerde TBA değerlerini 2.03-3.82 mg/kg aralığında saptamışlardır.

Başka bir çalışmada ise Soltanzadeh ve Ghiasi-Esfehani (21) sığır eti köftelerine % 1, % 3 ve % 5 oranlarında Aloe vera katıldığında +4 °C'de 7 gün depolama sonrası TBA değerlerinin % 3 ve % 5 Aloe vera içeren örneklerde azaldığını belirlemişlerdir. Genel olarak bizim çalışmamızdaki TBA değerleri kullanılan malzeme ve yöntemin farklılığına bağlı olarak bu çalışmalardan düşük çıkarken, depolamanın son döneminde dahi Gökalp ve arkadaşları (18) tarafından et ve ürünleri için sınır olarak belirtilen 0.7-1 mg/kg aralığını geçmedikleri anlaşılmıştır.

Çiğ örneklerin önemli özelliklerinden biriside renk değerleridir. Satış esnasında tüketici tercihinin etkileyen ilk kriterdir. Ancak renk değerleri kullanılan katkı maddelerinden etkilendiği gibi zamanla bozulma ile de değişime uğrayabilir. Bu nedenle yeni üretilen ürünlerde renk değişiminin takip edilmesinde yarar vardır. Çizelge 1'e bakıldığında L, a ve b değerleri üzerinde tragakant ve agar agar gamlarının avantajlı olabileceği söylenebilir. Konsantrasyon artışı 5 ve 10. günlerde

renk değerlerini etkilemiştir. Genel olarak konsantrasyon artışı kontrole göre örneklerin  $L$ ,  $a$  ve  $b$  değerlerini artırmıştır. Depolama süreleri ise  $L$  üzerinde etkisiz olurken,  $a$  değerlerinin bazılarında düşüşe,  $b$  değerlerinin bir örneğinde (% 0.5 tragakant) ise artışa sebep olmuştur. Son depolama döneminde, en yüksek  $L$  değerleri 48.49 ve 48.13 olarak, en yüksek  $a$  değerleri 1.94 ve 2.05 olarak, en yüksek  $b$  değerleri ise 12.54 ve 12.83 olarak % 0.5 tragakant ve % 1.5 agar agar ile hazırlanan köftelerde bulunmuştur. Renk üzerinde bileşenlerin doğal renkleri etkili iken oksidasyonda rengi değiştiren önemli bir reaksiyondur. Genellikle açık kırmızısı-sarı renge sahip olan gamlar miktar olarak arttıkça köftelerdeki renk değerlerini yükseltmişlerdir. Oksidasyon ise artış gösterdikçe hafifte olsa, sebep olduğu renk koyulaşmasından dolayı kırmızılık değerlerinde azalmaya sebep olmuştur. Çalışmamıza benzer şekilde, Cava ve arkadaşları (22) çeşitli lifler ile hazırladıkları tavuk ürünlerinde, çiğ örnekler için  $L$  değerlerini domates lifi ve % 3 pancar lifi ile hazırlanan örneklerde inülin içeren örnek ve kontrol örneğinden daha düşük saptamışlardır. İnülin ve pancar lifini % 1 ve % 2 oranında ilave ettiklerinde  $L$  değerlerinin arttığını bulmuşlardır. Örneklerin  $a$  değerleri domates lifi ilavesi ile artarken, pancar lifi ve inülin ilavesi ile azalmıştır. Ayrıca domates lifi ve pancar lifinin % 1 ve % 3 oranlarındaki ilaveleri  $b$  değerlerini kontrole göre önemli düzeyde artırmıştır. İnülin ilavesi çiğ tavuk ürünlerinin  $b$  değerlerinde bir değişim oluşturmamıştır. Bahsedilen çalışmada  $L$  değerleri 47.7-67.8,  $a$  değerleri 0.6-13.5 ve  $b$  değerleri 5.7-33.7 aralığında ölçülmüştür. Bizim çalışmamızdaki  $L$  ve  $a$  değerleri bu çalışmadaki sonuçlardan genel olarak daha düşüktür. Köftelerin  $b$  değerleri ise benzerlik göstermektedir. Bu farklılığın kullanılan malzeme ve doğal renk maddelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Demirci ve arkadaşları (2) farklı gamlar ile hazırladıkları et köftelerde gam türünün  $L$ ,  $a$  ve  $b$  değerlerini etkilemediğini, gam miktarının artmasının ise  $a$  ve  $b$  değerlerini etkilediğini bulmuşlardır. Çiğ örnek yüzeyinde  $L$  değerlerini 35.40-41.20 aralığında,  $a$  değerlerini 4.2-5.8,  $b$  değerlerini ise 10.24-12.7 aralığında ölçmüşlerdir. Gam miktarının artışı ile  $a$  değerinin azaldığını,  $b$  değerinin ise dalgalı bir değişim gösterdiğini vurgulamışlardır. Bu durumu gamların yapısındaki karotenoid gibi renk maddelerine bağlamışlardır. Çalışmamızda bulunan  $L$  ve  $b$  değerleri bu çalışmada verilen sonuçlardan

yüksek,  $a$  değerleri ise düşük bulunmuş, daha öncede bahsedildiği gibi bu durum kullanılan malzeme farklılığına bağlanmıştır.

### Kızarmış köftelerin renk değerleri

Çiğ örneklerde olduğu gibi kızarmış örneklerde de dikkati ilk çeken özelliklerden biri renktir. Özellikle kızarmış ürünlerde parlak altın sarısı renk arzu edilen bir durumdur (4). Çizelge 2'de kızarmış köftelerin renk değerleri verilmiştir. Çizelgeden gam tipinin  $L$  değerleri üzerindeki etkisi % 1 oranında önemli çıktığı anlaşılmaktadır. Gam seviyelerinin etkisi sadece tragakant gamında önemli çıkmıştır. Genel olarak, en iyi sonuçlar tragakant gamı ile hazırlanan örneklerde bulunurken, bu gamın seviyesinin artışı  $L$  değerinde düzensiz bir artışa sebep olmuştur. En yüksek  $L$  değeri 49.90 olarak % 1 tragakant gamı ile hazırlanan köftelerde bulunmuştur. Köftelerin  $a$  değerlerine bakıldığında, % 1 ve % 1.5 seviyelerinde gam tipinin etkisi önemli bulunmuştur. Konsantrasyon artışı tara gamında etkisiz olurken, tragakant gamı ile hazırlanan örneklerde  $a$  değerini düşürmüş, agar agar gamı ile hazırlanan örneklerde ise artırmıştır. Gam tiplerinde en iyi  $a$  değerlerini agar agar ortaya çıkarmış olup, kızartma sonrası en yüksek değerler 7.94 ve 8.28 olarak % 1 ve % 1.5 oranlarında agar agar gamı içeren köftelerde ölçülmüştür. Renk değerlerinden sonuncusu olan  $b$  değeri % 1 seviyesinde gam tiplerinden etkilenirken, konsantrasyon artışlarından etkilenmemiştir. Özellikle tragakant gamı daha iyi sonuçlar vermiş, en yüksek  $b$  değerleri 20.28 ve 20.24 olarak % 0.5 ve % 1 tragakant gamı içeren örneklerde saptanmıştır (Çizelge 2). Çalışmamıza benzer şekilde, Demirci ve arkadaşları (2) gamlar ile et köftelerde yaptıkları çalışmada pişmiş örneklerin  $L$  değerlerinin gam tipinden etkilendiğini,  $a$  ve  $b$  değerinin ise etkilendiğini bulmuşlardır. Gam miktarı arttıkça  $L$  ve  $b$  değerlerinin arttığını,  $a$  değerinin ise azaldığını gözlemlemişlerdir. Yaşarlar ve arkadaşları (23) pişmiş et köftelerin  $L$  ve  $a$  değerlerinin tahıl kepeği eklenmesi sonucu değiştiğini, eklenen kepek miktarı arttıkça  $L$  değerlerinin yükseldiğini,  $a$  değerinin ise düştüğünü saptamışlardır. Başka bir çalışmada, Khalil (24) nişasta-su karışımını yağ oranını düşürmek için et köftelere kattığında pişmiş örneklerde kontrole göre daha düşük  $a$  değerlerinin ortaya çıktığını gözlemlemiştir. Ayrıca benzer sonuçlar Lin ve Huang (25) ile Yılmaz ve Dağlıoğlu (26) tarafından

da saptanarak, bu değişimler çoğunlukla çalışma konusu olan malzemelerin doğal renk maddelerine bağlanmışlardır.

düşük ve kendi aralarında farksız bulunurken, agar agar gamının miktarının artması çap azalma oranlarını düşürmüştür. En düşük çap azalma

Çizelge 2. Gam tipi ve konsantrasyonunun kızarmış köftelerin renk özellikleri üzerine etkileri  
Table 2. Effects of gum type and concentration on color properties of fried meatballs

	Gam tipi Gum type	Gam konsantrasyonu Gum concentration			
		Kontrol (%0) Control (0%)	%0.5 0.5%	%1 1%	%1.5 1.5%
L	Tara	44.64 <sup>aA</sup>	47.11 <sup>aA</sup>	47.70 <sup>aA</sup>	45.31 <sup>aA</sup>
	Tragakant	44.64 <sup>aB</sup>	47.73 <sup>aAB</sup>	49.90 <sup>aA</sup>	46.71 <sup>aAB</sup>
	Agar agar	44.64 <sup>aA</sup>	47.24 <sup>aA</sup>	45.38 <sup>aA</sup>	44.65 <sup>aA</sup>
a	Tara	5.97 <sup>aA</sup>	5.49 <sup>aA</sup>	5.84 <sup>aA</sup>	5.88 <sup>aA</sup>
	Tragakant	5.97 <sup>aAB</sup>	6.24 <sup>aA</sup>	5.11 <sup>aB</sup>	5.39 <sup>aAB</sup>
	Agar agar	5.97 <sup>aB</sup>	6.75 <sup>aB</sup>	7.94 <sup>aA</sup>	8.28 <sup>aA</sup>
b	Tara	18.89 <sup>aA</sup>	19.64 <sup>aA</sup>	19.91 <sup>aB</sup>	18.80 <sup>aA</sup>
	Tragakant	18.89 <sup>aA</sup>	20.28 <sup>aA</sup>	20.24 <sup>aA</sup>	19.42 <sup>aA</sup>
	Agar agar	18.89 <sup>aA</sup>	19.96 <sup>aA</sup>	19.68 <sup>aA</sup>	19.35 <sup>aA</sup>

<sup>aC</sup> Her bir sütun içerisinde, her bir konsantrasyon için gamlar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>AB</sup> Her bir satır içerisinde, gam konsantrasyonları arası farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>aC</sup> Within each column, different superscript lowercase letters show differences between the gum types within each concentration ( $p < 0.05$ ).

<sup>AB</sup> Within each row, different superscript uppercase letters show differences between the gum concentrations within each storage period ( $p < 0.05$ ).

### Kızarmış köftelerin bazı teknolojik özellikleri

Kızarmış tavuk köftelerinin bazı teknolojik özellikleri bu tarz ürünlerde üretici ve tüketici tercihini etkileyen önemli faktörlerdir. Örneğin kızartma sonrası verim satılabilir ağırlığı etkilerken, çap değişimi paketlenme ve depolama gibi işlemlerde üretici performansını etkileyen hususlardır. Ayrıca köftenin nem ve yağ oranları kalori değerini etkileyeceğinden özellikle bilinçli tüketicilerin tercihinde önemli konulardır (2, 3, 10, 21). Çalışmamızda bu değerlere ait veriler Çizelge 3'te verilmiştir. Çizelgeden kızartma sonrası verim, çap azalması, nem tutma ve yağ emilim değerleri üzerinde gam tiplerinin etkili olduğu anlaşılırken, konsantrasyon artışı özellikle, verim, nem tutma ve yağ emilim üzerinde etkili olmuştur. Genel olarak, gamlar ile hazırlanan örneklerin verim değerleri kontrolden yüksek çıkmıştır. Verim üzerinde agar agar gamı daha etkili olurken, gam miktarının artması tara gamı ile hazırlanan örneklerdeki verimi düşürmüştür, tragakant ve agar agar gamı ile hazırlanan köftelerde ise düzensiz bir değişime sebep olmuştur. En yüksek kızartma sonrası verim oranı % 86.63 olarak % 0.5 tara ve % 86.90 olarak % 1 agar agar gamı ile hazırlanan köftelerde bulunmuştur. Örneklerin çap azalması değerleri gam içeren bütün köftelerde kontrolden daha düşük hesaplanmıştır. Tara gamı içeren köftelerin çap azalma değerleri genel olarak daha

miktarı % -0.01 olarak % 1 tara gamı ile hazırlanan örneklerde saptanmıştır (Çizelge 3). Yani bu grup köftelerde çok düşük oranda çap artışı gözlenmiştir. Verim ve çap azalma oranları ısı işlem etkisi ile et proteinlerinin denatürasyonundan olumsuz etkilenirken, çalışmada gamların jelatinize olması ve su tutma kapasiteleri bu değerleri olumlu etkilemiştir (2; 11). Çalışmamıza benzer şekilde, Modi ve arkadaşları (6) tarafından et köftelerde karagenan gamı ile yapılan çalışmada gam ilavesinin verimi artırırken, çap küçülme oranını düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca gam miktarının artışının bu değerleri daha da iyileştirdiği vurgulanmıştır. İlave edilen gamın su ve proteinlerin bir kompleks oluşturmasını kolaylaştırdığını söyleyerek, madde kaybını azalttığını, şekli ise koruduğunu belirtmişlerdir. Gibiş ve arkadaşları (27) sığır eti köftelerine % 0.5-3 aralığında mikrokristali selüloz eklediklerinde kızartma sonrası nem kaybının azaldığını ve verimin arttığını bulmuşlardır. Aloe vera ile yapılan başka bir çalışmada ise et köftelere % 0-5 aralığında bu malzemeyi eklemenin pişirme kaybını ve çap azalmasını düşürdüğü belirlenmiştir. Ayrıca aloe vera miktarının artmasının bu durumu desteklediği, bir hidrokolloid gibi davranarak pişme süresince su tutma kapasitesini artırdığı belirtilmiştir (21). Çalışmamızda kullanılan gamlar da benzer etki sergilemişlerdir.

Çizelge 3. Gam tipi ve konsantrasyonunun kızarmış köftelerin bazı teknolojik özellikleri üzerine etkileri (%)  
Table 3. Effects of gum type and concentration on some technological properties of fried meatballs (%)

	Gam tipi Gum type	Gam konsantrasyonu Gum concentration			
		Kontrol (%0) Control (0%)	%0.5 0.5%	%1 1%	%1.5 1.5%
Kızartma verimi Frying yield	Tara	81.78 <sup>ad</sup>	86.63 <sup>ba</sup>	85.00 <sup>ab</sup>	83.08 <sup>bc</sup>
	Tragakant	81.78 <sup>ab</sup>	83.55 <sup>bab</sup>	86.03 <sup>ba</sup>	82.55 <sup>bb</sup>
	Agar agar	81.78 <sup>ab</sup>	85.67 <sup>ba</sup>	86.90 <sup>ba</sup>	86.44 <sup>ba</sup>
Çap azalması Diameter reduction	Tara	5.34 <sup>ba</sup>	0.01 <sup>bb</sup>	-0.01 <sup>ab</sup>	0.01 <sup>bb</sup>
	Tragakant	5.34 <sup>ba</sup>	0.05 <sup>bb</sup>	2.52 <sup>ab</sup>	2.76 <sup>ab</sup>
	Agar agar	5.34 <sup>ba</sup>	5.16 <sup>ba</sup>	1.69 <sup>ab</sup>	0.90 <sup>bb</sup>
Nem tutma Moisture retention	Tara	71.72 <sup>ad</sup>	79.05 <sup>ba</sup>	76.72 <sup>ab</sup>	73.04 <sup>bc</sup>
	Tragakant	71.72 <sup>ac</sup>	75.09 <sup>bb</sup>	77.83 <sup>ba</sup>	73.16 <sup>bc</sup>
	Agar agar	71.72 <sup>ac</sup>	77.23 <sup>bb</sup>	79.27 <sup>ba</sup>	78.72 <sup>ba</sup>
Yağ emilim Fat absorption	Tara	3.29 <sup>ba</sup>	3.19 <sup>ba</sup>	2.46 <sup>bb</sup>	2.86 <sup>ab</sup>
	Tragakant	3.29 <sup>ba</sup>	2.92 <sup>ba</sup>	3.28 <sup>ba</sup>	2.03 <sup>ba</sup>
	Agar agar	3.29 <sup>bc</sup>	5.50 <sup>ba</sup>	4.28 <sup>bb</sup>	3.41 <sup>bc</sup>

<sup>ac</sup> Her bir sütun içerisinde, her bir konsantrasyon için gamlar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>ad</sup> Her bir satır içerisinde, her bir depolama süresi için, gam konsantrasyonları arası farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>ac</sup> Within each column, different superscript lowercase letters show differences between the gum types within each concentration ( $p < 0.05$ ).

<sup>ad</sup> Within each row, different superscript uppercase letters show differences between the gum concentrations within each storage period ( $p < 0.05$ ).

Kızartma sonrası nem tutma oranları genel olarak gam içeren örneklerde kontrolden daha yüksek olurken, yağ emilim değerlerinin tara ve tragakant gamı içeren örneklerde daha düşük çıktığı söylenebilir (Çizelge 3). Örneklerin içerisindeki gam miktarı artışı ile tara gamı nem tutma oranını azaltmış, tragakant gamı ve agar agar gamları ise artışa sebep olmuşlardır. En yüksek nem tutma oranları % 79.05 olarak % 0.5 tara gamı ve % 79.27 olarak % 1 agar agar gamı ile hazırlanan köftelerde hesaplanmıştır. Gam miktarı arttıkça yağ emilimi tara gamı ile hazırlanan örneklerde düzensiz bir şekilde azalırken, tragakant gamı ile hazırlananlarda etkilenmemiş, agar agar gamı ile hazırlanan köftelerde ise düşüş göstermiştir. Kızartma sonrası en düşük yağ emilimi % 2.46 olarak % 1 tara ve % 2.03 olarak % 1.5 tragakant içeren köftelerde bulunmuştur (Çizelge 3). Çalışmamıza benzer şekilde, Sanchez-Zapata ve arkadaşları (20) domuz etinden yapılan burgerlere ceviz lifi eklendiğinde nem tutma oranının arttığını bulmuşlardır. Ayrıca % 15 lif eklemenin % 5 ve % 10 seviyelerinden daha iyi sonuç verdiğini vurgulamışlardır. Pinero ve arkadaşları (28) sığır eti köftelerine % 13.45 oranında yulaf lifi eklemenin pişmiş örneklerde nem tutma oranını kontrole göre artırdığını bulmuşlardır. Demirci ve arkadaşları (2) et köftelere gam ilave etmenin pişmiş örneklerdeki nem kaybını önemli oranda azalttığını,

özellikle guar gamının önemli düzeyde etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Nem tutma oranı ile ilgili olarak benzer sonuçlar Ulu (11) ve Kurt ve Kılınççeker (29) tarafından yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir.

Yağ emilimi ile ilgili çalışmalara bakıldığında; bizim çalışmamıza benzer şekilde, Yaşarlar ve arkadaşları (23) et köftelere % 20 oranında çavdar kepeği ekleyerek gerçekleştirdikleri çalışmada kepek eklemenin pişmiş örneklerin yağ içeriğinde önemli oranda azalmaya sebep olduğunu bulmuşlardır. Santhi ve Kalaikannan (30) tavuk nuggetlere yulaf unu ilave etmenin pişmiş ürünlerde yağ oranını düşürdüğünü ve unun miktar artışının bunu desteklediğini belirtmişlerdir. Mansour ve Khalil (10) et köftelere buğday lifi eklemenin pişmiş örneklerdeki yağ oranını azalttığını bulmuşlardır. Ayrıca Soltanzadeh ve Ghiasi-Esfehani (21) et burgerlere % 5 oranında aleo vera ilave etmenin kızartılan örneklerde daha fazla nem tutulumuna sebep olduğunu, yağ emilim değerlerini ise önemli derecede düşürdüğünü gözlemişlerdir. Çalışmamızdaki bulgular bahsedilenlerle benzerlik içerisindedir.

### Kızartılmış köftelerin duyusal özellikleri

Duyusal nitelikler gıdaların kalitelerini belirlemede diğer önemli bir gruptur. Yeni üretilen ürünlerin



satışı ve tüketimi esnasında oluşabilecek tüketici düşüncesi hakkında fikir sahibi olabilmek için mutlaka belirlenmeleri gereklidir (3, 18). Bu özellikler ile ilgili sonuçlar çizelge 4'te verilmiş olup, çizelgeden gam tipinin görünüş ve tekstür üzerinde etkili iken, renk, koku ve tat üzerinde etkili olmadığı anlaşılmıştır. Gam miktarının değişimi ise agar agar gamı ile hazırlanan örneklerin görünüşü, rengi, tadı ve tekstürü üzerinde etkili olmuştur. Genel olarak, birçok duyuşsal özellik için gamlar ile hazırlanan köftelerde sonuçlar kontrolden daha yüksek bulunmuştur. En yüksek puanlara bakıldığında; görünüş 7.24-8.06, renk 7.43-8.06, koku 6.87-7.37, tat 7.12-7.62 ve tekstür puanları ise 6.93-7.24 aralıkları ile agar agar gamı ile hazırlanan kızarmış köftelerde bulunmuştur (Çizelge 4). Duyusal analiz sonuçlarına göre, çizelge 2'de de belirtildiği gibi agar agar gamının oluşturduğu kırmızı renk (a değeri) yoğunluğu köftelerin görünüş ve rengini olumlu etkilemiş, puanları yükseltmiştir. Ayrıca bu gruptaki örneklerin nem tutma oranının yüksek olması tat ve tekstürü de olumlu etkilemiştir. Panelistler tarafından belirtildiği gibi, özellikle kontrole kıyasla köftelerde daha sulu ve çiğnemesi hoş bir yapı oluşmuştur. Çalışmamıza benzer sonuçlar Demirci ve arkadaşlarının (2) farklı gamlar ile

hazırladıkları köftelerde, İbrahim ve arkadaşlarının (7) maltodekstrin ve nişasta ile hazırladıkları tavuk burgerlerde ve Yılmaz (31)'in buğday kepeği ile hazırladığı et köftelerde de bulunmuştur. Bu çalışmalarda da hidrokolloid özelliğe malzeme ilave etmenin et ürünlerinde bazı duyuşsal özellikleri geliştirdiği vurgulanmıştır.

## SONUÇ

Yapılan çalışma ile tavuk köftelerde gamların kullanımının bazı avantajlar sağlayabileceği belirlenmiştir. Çiğ örneklerin depolanması esnasında pH ve TBA değerlerindeki artış yavaşlatılabilirken, renklerdeki değişimin de kontrol altına alınabileceği anlaşılmıştır. Kızarmış örneklerde renk değerleri olumlu etkilenirken, verim ve tutulan nem miktarının artırılacağı, çap küçülmesi ve emilen yağ miktarının da azaltılabileceği gözlenmiştir. Bu değerlere bağlı olarak duyuşsal özelliklerin geliştirilebileceği anlaşılmış olup, bütün sonuçlara göre en uygun muameleyi belirtecek olursak, istatistiksel olarak agar agar gamının % 1 ve % 1.5 seviyelerinin daha avantajlı olacağı ortaya konulmuştur.

Çizelge 4. Gam tipi ve konsantrasyonunun kızarmış köftelerin duyuşsal özellikleri üzerine etkileri  
Table 4. Effect of gum type and concentration on sensory properties of fried meatballs

	Gam tipi Gum type	Gam konsantrasyonu Gum concentration			
		Kontrol (%0) Control (0%)	%0.5 0.5%	%1 1%	%1.5 1.5%
Görünüş Appearance	Tara	4.87 <sup>ab</sup>	5.62 <sup>ab</sup>	5.74 <sup>ab</sup>	5.31 <sup>ba</sup>
	Tragakant	4.87 <sup>ab</sup>	5.12 <sup>ab</sup>	6.00 <sup>ba</sup>	6.25 <sup>aba</sup>
	Agar agar	4.87 <sup>ac</sup>	7.74 <sup>abB</sup>	7.24 <sup>ab</sup>	8.06 <sup>ba</sup>
Renk Colour	Tara	5.43 <sup>ab</sup>	6.06 <sup>ab</sup>	6.43 <sup>ab</sup>	5.12 <sup>ba</sup>
	Tragakant	5.43 <sup>ab</sup>	4.93 <sup>ab</sup>	6.37 <sup>ab</sup>	6.12 <sup>ba</sup>
	Agar agar	5.43 <sup>ab</sup>	7.81 <sup>ab</sup>	7.43 <sup>ab</sup>	8.06 <sup>ba</sup>
Koku Odour	Tara	6.43 <sup>ab</sup>	6.25 <sup>ab</sup>	6.00 <sup>ab</sup>	5.31 <sup>ba</sup>
	Tragakant	6.43 <sup>ab</sup>	6.18 <sup>ab</sup>	6.31 <sup>ab</sup>	6.62 <sup>ba</sup>
	Agar agar	6.43 <sup>ab</sup>	6.87 <sup>ab</sup>	7.06 <sup>ab</sup>	7.37 <sup>ba</sup>
Tat Taste	Tara	5.37 <sup>ab</sup>	5.37 <sup>ab</sup>	5.56 <sup>ab</sup>	5.37 <sup>ba</sup>
	Tragakant	5.37 <sup>ab</sup>	5.81 <sup>ab</sup>	6.18 <sup>ab</sup>	6.56 <sup>ba</sup>
	Agar agar	5.37 <sup>ab</sup>	7.18 <sup>ab</sup>	7.12 <sup>ab</sup>	7.62 <sup>ba</sup>
Tekstür Texture	Tara	5.24 <sup>ab</sup>	5.25 <sup>ab</sup>	5.37 <sup>ab</sup>	5.06 <sup>ba</sup>
	Tragakant	5.24 <sup>ab</sup>	5.43 <sup>ab</sup>	5.93 <sup>aba</sup>	6.50 <sup>ba</sup>
	Agar agar	5.24 <sup>ab</sup>	7.06 <sup>ab</sup>	6.93 <sup>ab</sup>	7.24 <sup>ba</sup>

<sup>ac</sup> Her bir sütun içerisinde, her bir konsantrasyon için gamlar arasındaki farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>ac</sup> Her bir satır içerisinde, her bir depolama süresi için, gam konsantrasyonları arası farklılığı göstermektedir ( $p < 0.05$ ).

<sup>ac</sup> Within each column, different superscript lowercase letters show differences between the gum types within each concentration ( $p < 0.05$ ).

<sup>ac</sup> Within each row, different superscript uppercase letters show differences between the gum concentrations within each storage period ( $p < 0.05$ ).

**TEŞEKKÜR**

Bu çalışmanın yürütülmesinde teknik destek sağlayan Adıyaman Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Gıda İşleme Bölümü Öğrencileri Mehmet Ekinci, Ahmet Sabri Şahin ve Halil İbrahim Turan'a teşekkür ederim.

**KAYNAKLAR**

- Colmenero EL, Barreto G, Fernandez P, Carballo J. 1996. Frozen Storage of Bologna Sausages as a Function of Fat Content and Levels of Added Starch and Egg White. *Meat Sci*, 42, 325-332.
- Demirci ZO, Yılmaz I, Demirci AŞ. 2014. Effects of Xanthan, Guar, Carrageenan, and Locust Bean Gum Addition on Physical, Chemical, and Sensory Properties of Meatballs. *J Food Sci Technol*, 51, 936-942.
- Kılınççeker O. 2015. Some Quality Characteristics of Fish Meatballs Manufactured With Different Vegetable-Based Flours. *Gıda*, 4, 61-67.
- Kılınççeker O, Hepsağ F, Kurt S. 2015. The Effects of Lentil and Chickpea Flours as the Breeding Materials on Some Properties of Chicken Meatballs During Frozen Storage. *J of Food Sci Technol*, 52, 580-585.
- Ulu H. 2004. Effect of Wheat Flour, Whey Protein Concentrate and Soya Protein Isolate on Oxidative Process and Textural Properties of Cooked Meatballs. *Food Chem*, 87, 523-529.
- Modi VK, Yashoda KP, Naveen SK. 2009. Effect of Carrageenan and Oat Flour on Quality Characteristics of Meat Kofta. *Int J of Food Prop*, 12, 228-242.
- Ibrahim MA, Salama MF, Hussein AA. 2011. Production of Low-Fat Chicken Burger. *Aust J Basic Appl Sci*, 5, 3149-3154.
- Tabarestani HS, Tehrani MM. 2014. Optimization of Physicochemical Properties of Low-Fat Hamburger Formulation Using Blend of Soy Flour, Split-Pea Flour and Wheat Starch as Part of Fat Replacer System. *J Food Proc Pres*, 38, 278-288.
- Giese J. 1992. Developing Low-Fat Meat Products. *Food Technol*, 46, 100-108.
- Mansour EH, and Khalil AH. 1997. Characteristics of Low-Fat Beef Burger as Influenced by Various Types of Wheat Fibers. *Food Res Int*, 30, 199-205.
- Ulu H. 2006. Effects of Carrageenan and Quar Gum on the Cooking and Textural Properties of Low Fat Meatballs. *Food Chem*, 95, 600-605.
- Caprioli I, Q'Sullivan M, Monahan FJ. 2009. Use of Sodium Caseinat/Glycerol Edible Films to Reduce Lipid Oxidation in Sliced Turkey Meat. *Eur Food Res Technol*, 228, 433-440.
- Özen BÖ, Eren M, Pala A, Özmen İ, Soyer A. 2011. Effect of Plant Extracts on Lipid Oxidation During Frozen Storage of Minced Fish Muscle. *Int J of Food Sci Technol*, 46, 724-731.
- Lopes BM, Lessa VL, Silva BM, Filho MA, Schnitzler E, Lacerda LG. 2015. Xanthan gum: Properties, Production Conditions, Quality and Economic Perspective. *J of Food Nut Res*, 54, 185-194.
- Ockerman HW. 1985. pH measurement. In: Quality Control of Post Mortem Muscle Tissue (2ndedn.). The Ohio State University, Columbus Ohio.
- Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT. 1960. A Distillation Method for the Quantitative Determination of Malonaldehyde in Rancid Foods. *J Am Oil Chem*, 37, 44-48.
- AOAC. 2002. Official Methods of Analysis (17<sup>th</sup> ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Gokalp HY, Kaya M, Tulek Y, Zorba O. 1999. *Laboratory Application Guide and Quality Control in Meat and Meat Products* (In Turkish). Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yay No: 318, Erzurum, Turkey.
- Can ÖP. 2012. The Effect of Thyme Oil on the Shelf Life of Chicken Balls During Storage Period. *Slov Vet Res*, 49, 19-26.
- Sanchez-Zapata E, Munoz CM, Fuentes E, Fernandez-Lopez J, Sendra E, Sayas E, Navarro C. 2010. Effect of Tiger Nut Fiber on Quality Characteristics of Pork Burger. *Meat Sci*, 85, 70-76.
- Soltanizadeh N, Ghiasi-Esfahani H. 2015. Qualitative Improvement of Low Meat Beef Burger Using Aloe Vera. *Meat Sci*, 99, 75-80.
- Cava R, Ladero L, Cantero V, Ramirez MR. 2012. Assessment of Different Dietary Fibers (tomato fiber, beet root fiber, and inulin) for the Manufacture of Chopped Cooked Chicken Products. *J Food Sci*, 77, 46-52.

23. Yaşarlar, EE, Dağlıoğlu O, Yılmaz I. 2007. Effects of Cereal Bran Addition on Chemical Composition, Cooking Characteristics and Sensory Properties of Turkish Meatballs. *Asian J Chem*, 19, 2353-2361.
24. Khalil AH. 2000. Quality Characteristics of Low-Fat Beef Patties Formulated with Modified Corn Starch and Water. *Food Chem*, 68, 61-68.
25. Lin KW, Huang HY. 2003. Konjac/Gellan Gum Mixed Gels Improve the Quality of Reduced Fat Frankfurters. *Meat Sci*, 65, 749-755.
26. Yılmaz I, Dağlıoğlu O. 2003. The Effect of Replacing Fat with Oat Bran on Fatty Acid Composition and Physicochemical Properties of Meatballs. *Meat Sci*, 65, 819-823.
27. Gibis M, Schuh V, Weiss J. 2015. Effects of Carboxymethyl Cellulose (CMC) and Microcrystalline Cellulose (MCC) as Fat Replacers on the Microstructure and Sensory Characteristics of Fried Beef Patties. *Food Hydro*, 45, 236-246.
28. Pinero MP, Parra K, Huerta-Leidenz N, Moreno LA, Ferrer M, Araujo S, Barboza Y. 2008. Effect of Oat's Soluble ( $\beta$ -glucan) as a Fat Replacer on Physical, Chemical, Microbiological and Sensory Properties of Low-Fat Beef Patties. *Meat Sci*, 80, 675-680
29. Kurt Ş, Kılınççeker O. 2012. The Effects of Cereal and Legume Flours on the Quality Characteristics of Beef Patties. *Kafkas Univ Vet Fak Der*, 18, 725-730.
30. Santhi D, Kalaikannan A. 2014. The Effect of Addition of Oat Flour in Low-Fat Chicken Nuggets. *J Nutr Food Sci*, 4, 1-4.
31. Yılmaz I. 2005. Physicochemical and Sensory Characteristics of Low Fat Meatballs with Added Wheat Bran. *J of Food Eng*, 69, 369-373.

## AYDIN İLİNDE ÜRETİLEN İNEK SÜTLERİNDE BAZI AĞIR METAL DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aslıhan İnci<sup>1</sup>, Serap Ünübol Aypak<sup>1\*</sup>, Gülşen Güven<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Aydın

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, Aydın

Geliş tarihi / Received: 02.08.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 10.11.2016

Kabul tarihi / Accepted: 17.12.2016

### Öz

Aydın il merkezinden ve Bozdoğan, Çine, Söke, Yenipazar ve Nazilli ilçelerinden 203 adet çiğ süt örneği ağır metal analizi yapılmak üzere toplanmıştır. Toplanan süt örnekleri mikrodalga fırında çözünürleştirilmiş ve ICP-OES ile Fe, Mn, Zn, Cu, Cd ve Pb analizleri yapılmıştır. En yüksek Fe ortalaması 1704.80 µg/L ile Bozdoğan ilçesinde, en yüksek Mn ortalaması 5.08 µg/L ile Aydın Merkez ilçede, en yüksek Zn ortalaması 1468.39 µg/L ile Yenipazar ilçesinde tespit edilmiştir. Bütün ilçelerin süt örneklerinde, Cu, Cd ve Pb değerleri tayin edilebilir sınırların altında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, literatür verileri ve FAO, WHO ve PMTDI'nın belirtmiş olduğu tolere edilebilir sınırlar göz önüne alınarak değerlendirildiğinde Aydın merkez ve diğer ilçelerde üretilen sütlerde sağlık açısından tehlike oluşturacak bir ağır metal kontaminasyonu olmadığı anlaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Ağır metal, Aydın, çevre kirliliği, süt.

## INVESTIGATION OF SOME HEAVY METAL LEVELS IN COW MILK COLLECTED FROM AYDIN PROVINCE

### Abstract

In our study; 203 raw milk samples were collected from Aydın city center and Bozdoğan, Çine, Söke, Yenipazar and Nazilli districts. Collected milk samples were solubilized in a microwave oven and Fe, Mn, Zn, Cu, Cd and Pb levels were analyzed using ICP-OES. The highest value for Fe (1704.80 µg/L) was found from the samples collected in Bozdoğan district, for Mn (5.08 µg/L) from Aydın Central district and for Zn (1468.39 µg/L) from Yenipazar district. Meanwhile, Cu, Cd and Pb values were found under measurable limits for all the collected milk samples. Considering the tolerable values indicated by literature data, FAO, WHO and PMTDIs, the heavy metal levels in milk samples collected from Aydın and districts around, were found to be under the levels of concern for health problems.

**Keywords:** Aydın, environmental pollution, heavy metal, milk.

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

Bu makale Aslıhan İnci'nin yüksek lisans tezinden özetlenmiştir./This paper is summarized from Aslıhan İnci's graduation thesis.

✉ serapunubol@yahoo.com,

☎ (+90) 256 247 0700/264,

☎ (+90) 256 247 0120

## GİRİŞ

Toksik etkileri, uzun yıllarca yok olmamaları, doğada ve biyosferde birikmeleri nedeniyle ağır metaller kirleticiler arasında önemli bir yere sahiptirler. Sanayileşme ve kentleşmenin gelişmesi, hava, toprak, suyun, dolayısıyla besin kaynaklarının ağır metallerle kontamine olmasına sebep olmuştur. İnsanların tükettiği doğal gıdaların yapısı, endüstrinin gelişmesi ile gün geçtikçe bozulmaktadır. Toprağın, havanın ve suyun kirlenmesine bağlı olarak bitkisel ve hayvansal gıdaların bileşimi değişmektedir. Gıda maddelerine bulaşan toksik maddeler içinde insan sağlığını en fazla tehdit eden ve zararlı olarak bilinen grup ağır metallerdir (1). Bunlar, canlılar tarafından belirli bir konsantrasyonun üzerinde alındığında hücrenin metabolizmasına ve gelişimine zarar vererek toksik etki yaparlar. Ağır metaller yüksek oranlarda maruz kalınmasının, karsinogenik, mutajenik ve teratojenik etkileri olduğu bilinmektedir (2).

Gıdalardaki ağır metal kontaminasyonu; insan ve hayvan sağlığını tehdit etmesi yanında, gıda sanayinde de ciddi kayıplara yol açan, ticareti olumsuz etkileyen bir durumdur (3, 4). Süt, memelilerde neonatal dönemde tüketilmeye başlanan, büyüme ve gelişme için elzem olan bir besin maddesidir. Ağır metal iyonlarının süte bulaşması, toprak, su ve havadan, ayrıca üretim esnasında kullanılan metalik alet ve ekipmanlardan, depolama ve dağıtım sırasında kullanılan ambalaj materyallerinden olmaktadır (5). Bu çalışmanın amacı Aydın ili ve bazı ilçelerinde üretilen sütlerin ağır metal düzeylerinin araştırılması ve bu düzeylerin sağlık açısından bir risk taşıyıp taşımadığının belirlenmesidir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Bu çalışmada materyal olarak çiğ süt örnekleri kullanılmıştır. Sütler, Aydın merkez ve merkeze bağlı 5 ilçeden olmak üzere toplam 6 bölgeden alınmıştır. Sanayi bölgesine ve trafiğe yakın bölgeler olarak Aydın merkez, Çine ve Söke; kırsala yakın olan bölgeler olarak ise Bozdoğan, Nazilli ve Yenipazar seçilmiştir. Örnekler, hayvanların ahırda tutulduğu Ocak-Şubat-Mart aylarında toplanmıştır.

## Yöntem

Süt örneklerinin çözünürleştirme işlemleri Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Mars X Press marka mikrodalga fırın ile yapılmıştır. Teflon tüplere 0.5 ml süt, üzerine 9 ml %65'lik HNO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich Lot # SZBE 2170V) ve 1 ml %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma Aldrich Lot#SZBE 1010V) ilave edildikten sonra mikrodalga fırın ile çözünürleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra teflon kaplardaki örnekler 25 ml'lik balon jöjelere alınmış ve 25 ml çizgisine kadar deiyonize su ile tamamlanarak analize hazırlanmıştır (6, 7). Çözünürleştirilmiş süt örneklerindeki bazı ağır metal düzeyleri Prism marka (Teledyne Leeman Lab, ABD) ICP-OES ile okunmuştur. ICP-OES'te kullanılmak üzere her bir element için 5 tane standart ve bir tane kör olmak üzere 6 adet çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak 5 noktalı kalibrasyon eğrileri çizildikten sonra süt örneklerindeki ağır metal düzeyleri analiz edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Aydın merkez ilçesinden toplanan süt örneklerinde ortalama Fe, Mn, Zn düzeyleri Çizelge 1'de gösterilmiştir. Tüm örneklerde bakır, kadmiyum ve kurşun tayin edilebilir sınırların altında bulunmuştur. Güven aralığı her element için ayrı hesaplanmış olup hesaplamada, standart sapma  $\times 10 / \text{eğim}$  değeri formülünden yararlanılmıştır (6, 8).

Çevre kirliliğinin önemli göstergelerinden biri olan ağır metaller, havayı, toprağı ve suyu yüksek oranda kontamine edebilirler. Topraktaki ağır metal düzeyinin artışı, bitki dokularındaki ağır metal birikimini arttırmaktadır. Bitkilerin besin olarak tüketilmesi sonucu ağır metaller insan ve hayvanların dokularında birikmektedir. Yemler ve çevresel kaynaklardan alınan ağır metaller sütün salgılanması sırasında meme bezlerinden geçebilmekte ve bu yolla süte bulaşmaktadır (9).

Gıda Katkı Maddeleri FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA) tarafından belirlenen günlük demir alım dozu 10-20 mg/kg vücut ağırlığıdır. Ayrıca JECFA tarafından, demirin geçici maksimum tolere edilebilir günlük alımı (PMTDI) ise 0.8 mg/kg vücut ağırlığı olarak bildirilmiştir (10). National Academy of Sciences da yayınlanan Diyet Referans Alımı (DRI) 2004 verilerine göre

Çizelge 1. Aydın ili ve ilçelerinde üretilen sütlerdeki bazı ağır metal düzeyleri  
Table 1. Some heavy metal levels in cow's milk produced in Aydın province.

	N	Ortalama [ $\mu\text{g/L}$ ] $\pm$ Standart Hata Mean [ $\mu\text{g/L}$ ] $\pm$ Standart Error	N	Ortalama [ $\mu\text{g/L}$ ] $\pm$ Standart Hata Mean [ $\mu\text{g/L}$ ] $\pm$ Standart Error	N	Ortalama [ $\mu\text{g/L}$ ] $\pm$ Standart Hata Mean [ $\mu\text{g/L}$ ] $\pm$ Standart Error
	Fe		Mn		Zn	
Aydın	50	960.13 $\pm$ 105.74	41	5.08 $\pm$ 0.61	51	811.69 $\pm$ 22.37
Bozdoğan	22	1704.80 $\pm$ 379.54	24	1.31 $\pm$ 0.20	25	1363.18 $\pm$ 63.99
Çine	49	925.34 $\pm$ 106.52	49	0.87 $\pm$ 0.09	55	1293.94 $\pm$ 66.65
Söke	12	1381.02 $\pm$ 237.13	13	4.61 $\pm$ 0.37	13	971.11 $\pm$ 51.03
Yenipazar	14	1256.39 $\pm$ 241.72	13	1.95 $\pm$ 0.38	15	1468.39 $\pm$ 114.35
Nazilli	40	1313.50 $\pm$ 214.51	22	1.16 $\pm$ 0.24	42	885.43 $\pm$ 38.38
Genel <i>General</i>		1256.89		2.49		1132.29

mangan mineraline ait tavsiye edilen günlük alım miktarı 1.6-2.3 mg/gündür (11). Sütteki çinko miktarı diğer elementlere göre oldukça yüksek olup, besinlerle günlük alınması gereken çinko için FAO/WHO'nun bildirdiği tolere edilebilir miktar, 1 mg/kg vücut ağırlığı düzeyindedir (7). Sütte bakır miktarı oldukça düşüktür ancak sütün kontamine olması halinde bu değer yükselir. Kontaminasyon; üretim esnasında kullanılan metalik alet ve ekipmandan, depolama ve dağıtım sırasında kullanılan ambalaj materyallerinden kaynaklanmaktadır. FAO/WHO tarafından, tereyağı ve peynir altı suyundan elde edilmiş tereyağı ve saf süt yağı için bakırın maksimum limitlerini 0.05 mg/kg olarak bildirilmiştir (12). JECFA, geçici maksimum tolere edilebilir günlük bakır alımını 0.5 mg/kg olarak bildirmiştir (7). Kadmiyum için FAO/WHO'nun belirlediği haftalık alınabilir miktar (PTWI) 0.007 mg/kg vücut ağırlığıdır (3, 13). Türk Gıda Kodeksine göre sütteki kurşun miktarı 0.020 mg/kg'ı geçmemelidir (14). FAO/WHO kurşun için tolere edilebilir haftalık alım miktarını 0.025 mg/kg olarak belirlemiştir (7).

Süt ve süt ürünlerinde ağır metal düzeylerinin araştırılmasına yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalara ait sonuçlar Çizelge 2' de özetlenmiştir.

Şimşek ve arkadaşları (15) Bursa'da trafiğe yakın bölge, endüstri bölgesi ve kırsal kesimden topladıkları 75 adet süt örneğini, bazı ağır metaller açısından incelemiştir. Araştırmacılar bütün elementler için en yüksek ortalamaya sahip olan bölgenin endüstri bölgesi olduğunu, ikinci sırada trafiğe yakın bölgenin geldiğini belirtmişlerdir. Endüstri bölgesi ve trafiğe yakın bölge için bildirilen kurşun ortalamasının, Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt

Tebliğinde belirtilen kurşun ortalaması olan 0.02 mg/kg'dan yüksek olduğu, kırsal alanın kurşun ortalamasının ise düşük olduğu görülmüştür. Bu kurşun kontaminasyonuna sebep olarak trafiğe yakın bölgede araç sayısının fazla olması gösterilmiş, bölgedeki hayvanların hem solunum ile hem de besinler yoluyla kuşuna maruz kalmış olabilecekleri belirtilmiştir. Yine Ayar ve arkadaşlarının (16) Konya yöresinde, Çardak ve arkadaşlarının (6) Aydın'da, Temiz ve Soylu'nun Samsun'da (17) süt ve süt ürünlerinde yaptıkları ağır metal analizlerinde kurşun ortalaması çiğ süt tebliğinde belirtilen 0.02 mg/kg değerinden yüksek bulunmuştur. Sola-Larranaga ve Navarro-Blasco (18), İspanya'nın kuzeyindeki Navarra kentinde yaptıkları çalışmada, çinko, mangan ve kurşun ortalamalarını yüksek olarak tespit etmişlerdir. Licata ve arkadaşları (19), Caggiano ve arkadaşları (20), Anastasio ve arkadaşları (21), İtalya'da yaptıkları çalışmalarda yüksek kadmiyum ve kurşun düzeyleri tespit etmişlerdir. Rodriguez-Rodriguez ve arkadaşlarının İspanya'da (22), Birghila ve arkadaşlarının Romanya'da (23), Ataro ve arkadaşlarının Güney Afrika'da (24), Tajkarimi ve arkadaşlarının İran'da (25), Elham ve arkadaşlarının Mısır'da (26) yaptıkları çalışmalarda sütlerdeki kurşun düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışmamızdaki kurşun, kadmiyum ve bakır ortalamaları tayin edilebilir sınırların altında olup; Lante ve arkadaşlarının (27) çalışmasında olduğu gibi tespit edilememiştir. Tespit ettiğimiz demir, mangan ve çinko düzeyleri Benincasa ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzer şekilde düşüktür (28). Demir ortalaması en yüksek olan ilçe Bozdoğan, mangan ortalaması en yüksek olan ilçe Aydın merkez, çinko ortalaması en yüksek olan ilçe Yenipazar olup, literatür verileriyle

Çizelge 2. Sütteki ağır metal içerikleriyle ilgili literatürler.  
Table 2. Related literatures to heavy metal content in milk..

Literatür Literature	Fe (µg/L)	Mn (µg/L)	Zn (µg/L)	Cu (µg/L)	Cd (µg/L)	Pb (µg/L)
Şimşek ve ark (2000) [15]						
Trafiğe yakın bölge	1780		4490	580		32
Endüstri bölgesi	4270	-	5010	960	-	49
Kırsal bölge	1010		3770	390		18
Özrenk (2002) [4]	3003	66	3003	182	-	2
Ayar ve ark (2007) [16]	-	-	-	-	17	103
Çardak ve ark (2011)	1260	-	-	1570	-	40-110
İstanbuluoğlu ve ark (2013) [13]	-	-	-	-	0.1	-
Temiz ve Soylu (2012) [17]	392	48	13333	1084	7	43
Sola-Larranaga ve Navarro-Blasco (2009) [18]	290	29.1	4631	51.8	0.40	5.23
Birghila ve ark (2008) [23]	-	-	980	170	0.004	0.12
Licata ve ark (2004) [19]	-	-	2016	1.98	0.02	1.32
Lante ve ark (2006) [27]	-	-	3600	TE (ND)	TE (ND)	TE (ND)
Benincasa ve ark (2008) [28]	325	31.9	3814	-	-	-
Rodríguez-Rodríguez ve ark (1999) [22]	-	-	-	-	-	14.82
Ataro ve ark (2008) [24]	-	-	-	-	TE (ND)	TSA (BDL)
Caggiano ve ark (2005) [20]	-	0.13	-	-	60	200
Anastasioa ve ark (2006) [21]	-	-	-	-	0.05	180
Vidovic ve ark (2005) [9]	-	-	1.64	-	0.0071	-
Tajkarimi ve ark (2008) [25]	-	-	-	-	-	7.9
Elham ve ark (2011) [26]	3860	-	1209	945	7	327

TSA: Tayin sınırının altında. BDL:Below detection limit.  
TE: Tespit edilememiş. ND: Not detected.

karşılaştırıldığında, sonuçlarımızın bazı çalışmalara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, esansiyel olan bu elementlerin günlük alınması gereken miktarları göz önünde bulundurulduğunda bulunan bu değerlerin yüksek olmadığı, hatta bu elementlerin sütte düşük düzeyde olmayışının, hem süt veren ineklerin sağlığı açısından, hem de süt tüketen insanlar için önem arz ettiği görülmüştür. Tamamen toksik ağır metaller olan kurşun ve kadmiyumu da sütlerde tespit edemememiz sağlığa zararlı bir kontaminasyonun olmadığını göstermektedir. Ancak bu elementler toksik ağır metaller olmaları ve kronik maruziyetlerin de son derece ciddi sağlık sorunlarına yol açmaları nedeniyle çalışmaların, ICP-MS gibi daha hassas cihazlarla yapılması, sağlık açısından herhangi bir risk oluşturmasa bile en küçük kontaminasyonunun tespit edilebilmesinin, önlem almak adına yararlı olacağı düşünülmektedir.

## SONUÇ

Aydın ilinde, 2014 yılı kış mevsiminde üretilen sütlerde tespit limitleri üzerinde ağır metal kirliliğine rastlanmaması, halk sağlığı açısından olumludur. Ancak sonraki dönemlerde yapılacak analizlerde, farklı sonuçlarla karşılaşılabilirliği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu açıdan bakıldığında T.C.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın Ulusal Kalıntı İzleme Planı kapsamında alınan örneklerin sayısının artırılması ve özellikle sanayinin ve trafiğin çok yoğun olduğu büyük şehirlerde ağır metal analizlerinin sıklıkla yapılması önerilmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-14023 nolu proje ile desteklenmiştir. Süt örneklerini toplamamızda bizlere yardımcı olan başta Aydın Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü olmak üzere, Bozdoğan, Çine, Söke, Yenipazar ve Nazilli İlçe Müdürlüklerine teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Vercruyse A. 1984. *Hazardous Metals in Human Toxicology*. Amsterdam, The Netherlands, 238 p.
2. Rether A. 2002. Entwicklung und Charakterisierung wasserlöslicher Benzoylthioharnstoff funktionalisierter Polymere zur selektiven Abtrennung von Schwermetallionen aus Abwässern und Prozesslösungen, Münih Teknik Üniversitesi, Doktora Tezi, Münih, Almanya.

3. Kınık Ö, Akbulut N, Karagözlü C. 2002. *Süt ve Süt Ürünlerinde Kalıntı ve Kontaminantlar*. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, 140 s.
4. Özrenk E. 2002. Van ili ve ilçelerinde üretilen inek sütlerinin ağır metal kirlilik düzeyi ve bazı mineral madde içerikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Van, Türkiye, 78 s.
5. FAO. Codex General Standard for Contaminants and Toxins In Foods Codex Stan, 2007. [http://foodsafetyindia.nic.in/General Standard for Contaminants and Toxins in Foods. pdf](http://foodsafetyindia.nic.in/General_Standard_for_Contaminants_and_Toxins_in_Foods.pdf) (Erişim tarihi: 20.11.2014).
6. Çardak AD, Gülşen G, Demir M. 2011. Mineral and trace elements in dairy products *Milchwissenschaft*. 66(4): 365-367.
7. FAO/WHO. 2001. Summary of Evaluations Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec453.htm> (Erişim tarihi: 20.11.2014).
8. Franson MAH. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19<sup>th</sup> ed., American Public Health Association, Washington, 20 p.
9. Vidovic M, Sadibasic A, Cubic S, Lausevic M. 2005. Cd and Zn in atmospheric deposit, soil, wheat and milk. *Environ Res*. 97: 26-31.
10. WHO. 1999. Complementary feeding and the control of iron deficiency anemia in the newly independent states Presentation by WHO at a WHO/UNICEF Consultation Geneva, Switzerland, [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0006/119769/E68015.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/119769/E68015.pdf?ua=1) (Erişim tarihi: 20.11.2014).
11. Dietary Reference Intakes. 2004. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Washington (DC): National Academies Press (US).
12. Bremner I. 1984. Copper and Human Health, <http://www.copperinfo.co.uk/health/downloads/pub-34-copper-and-humanhealth.pdf> (Erişim tarihi: 20.11.2014).
13. İstanbulluoğlu H, Oğur R, Tekbaş ÖF, Bakır B. 2013. Süt ve Süt ürünlerinde Ağır Metal Kirliliği. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 33(2): 410-419.
14. Anon 2012. Türk Gıda Kodeksi, Koyulaştırılmış süt ve sütozlarının kimyasal analizi için numune alma metotları tebliği (tebliğ no: 2012/3) 04.01.2012 Tarih ve 28163 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
15. Şimşek O, Gültekin R, Öksüz O, Kurultay S. 2000. The effect of environmental pollution on the heavy metal content of raw milk. *Nabrunğ*. 44: 360-363.
16. Ayar A, Sert D, Akın N. 2007. Konya'da tüketime sunulan süt ve ürünlerinin ağır metal içeriklerinin belirlenmesi. *S Ü Ziraat Fakültesi Dergisi*. 21 (41): 58-64.
17. Temiz H, Soylu A. 2012. Heavy metal concentrations in raw milk collected from different regions of Samsun, Turkey. Doi:10. 1111/j.1471-0307.2012.00846.x
18. Sola-Larranaga C, Navarro-Blasco I. 2009. Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of Navarra, Spain. *Food Chem*. 12: 189-196.
19. Licata P, Trombetta D, Cristani M, Giofre F, Martino D, Calo M, Naccari F. 2004. Levels of toxic and essential metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environ Int*. 30: 1-6.
20. Caggiano R, Sabia S, D'Emilio M, Macciato M, Anastasio A, Ragosta M, Paino S. 2005. Metal Levels in fodder, milk, dairy products, and tissues sampled in ovine farms of southern Italy. *Environ Res*. 99: 48-57.
21. Anastasio BA, Caggiano R, Macchiato M, Paolod C, Ragostae M, Painof S, Cortesi ML. 2006. Heavy metal concentrations in dairy products from sheep milk collected in two regions of southern Italy. *Acta Vet Scand*. 47: 69-74.
22. Rodriguez-Rodriguez EM, Delgado-Uretra E, Diaz-Romero C. 1999. Concentrations of cadmium and lead in different types of milk. *Z Lebensm Unters Forsch*. 208: 162-168.
23. Birghila S, Dobrinas S, Stanciu G, Soceanu A. 2008. Determination of major and minor elements in milk through ICP-AES. *Environ Eng Manag J*. 7 (6): 805-808.



24. Ataro A, McCrindle RI, Botha BM, McCrindle CME, Ndibewu PP. 2008. Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry [ICP-MS]. *Food Chem.* 111: 243-248.
25. Tajkarimi M, Faghih MA, Poursoltani H, Nejad AS, Motallebi AA, Mahdavi H. 2008. Lead residue levels in raw milk from different regions of Iran. *Food Control.* 19: 495-498.
26. Elham M S, Ahmed MH, Sanna MB, Amr A. Mostafa A. 2011. Survey of selected essential and heavy metals in milk from different regions of Egypt using ICP-AES. *Food Addit Contam.* B(4): 294-298.
27. Lante A, Lomolino G, Cagnin M, Spettoli P. 2006. Content and characterisation of minerals in milk and in crescenza and squacquerone Italian fresh cheeses by ICP-OES. *Food Control.* 17: 229-233.
28. Benincasa, C, Lewis, J, Sindona G, Tagarelli A. 2008. The use of multi element profiling to differentiate between cow and buffalo milk. *Food Chem.* 110: 257-262.

## ELAZIĞ YÖRESİNDE YETİŞTİRİLEN KÖSETEVEK ÜZÜM ÇEŞİDİNİN KIRMIZI ŞARAP ÜRETİMİNE UYGUNLUK DURUMUNUN BELİRLENMESİ\*

Tuba Eda Arpa, Turgut Cabaroğlu\*\*

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana

Geliş tarihi / Received: 23.11.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 15.12.2016

Kabul tarihi / Accepted: 16.12.2016

### Öz

Bu çalışmada, Elazığ yöresinde yetiştirilen Kösetevek üzüm çeşidinin kırmızı şarap üretimine uygunluk durumu araştırılmıştır. Kösetevek üzümünün taneleri orta büyüklükte ve elipsoidal şekilli, meyve eti renkli ve sulu bir çeşittir. Kösetevek üzümünün olgunluk takibi, salkım, tane yapısı, üzümün olgunluk durumu, şıranın bileşimi ve üzümün fenolik bileşiklerinin potansiyeli fiziksel, kimyasal ve spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Kösetevek üzümünün olgunluk anında ortalama salkım ağırlığının 317.4 g, tane ağırlığının 2.16 g olduğu, tanede pulp, kabuk ve çekirdek oranlarının sırasıyla %82.2, %14.6, %3.2 olduğu belirlenmiştir. Şırada toplam asit 5.1 g/L, indirgen şeker 227.3 g/L olarak saptanmıştır. Üzümde toplam fenolik bileşik indisi (A280) 56.4, toplam antosiyanin miktarı 912.1 mg/L, çözünebilir antosiyanin miktarı 503.8 mg/L ve çekirdek tanenin olgunluk indisi (%Mp) 55.3 bulunmuştur. Kösetevek üzümü genel olarak değerlendirildiğinde toplam asitlik değerinin beklenenden düşük olduğu ancak renk potansiyeli, fenolik bileşikler, şıra verimi ve şeker oranı bakımından kalite kırmızı şarap üretimi için uygun bir çeşit olduğu saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Kösetevek, üzüm, kalite, kırmızı şarap.

## DETERMINATION OF SUITABILITY OF KOSETEVEK GRAPE VARIETY CULTIVATED IN ELAZIĞ PROVINCE FOR THE PRODUCTION OF RED WINE

### Abstract

In this study, suitability of Kösetevek, a black grape variety, grown in Elazığ region for red wine production investigated. The physical properties of this variety were medium-sized and ellipsoidal-shaped berry, coloured and juicy pulp. Monitoring of maturity, bunch and berry structure, maturity state, composition of juice, potential phenolic compounds and phenolic maturity of grapes was determined by physical, chemical and spectrophotometric analyses. While the average bunch and berry weight reached 317.4 g and 2.16 g respectively, rate of pulp, skin and seeds were determined %82.2, %14.6 and %3.2 at maturity stage respectively. It was reported that total acid was 5.1 g/L and reducing sugar was 227.3 g/L in the juice. In Kösetevek grape, total phenolic index (A280), total anthocyanin content, extractable anthocyanin content and maturity index of seed tannin (%Mp) were 56.4, 912.1 mg/L, 503.8 mg/L and 55.3, respectively. In general evaluation of Kösetevek variety, the total acidity was lower than expected but it is a suitable variety for quality red wine production in terms of rich colour potential, phenolic compounds, yield of juice and sugar content.

**Keywords:** Kösetevek, grape, quality, red wine.

\* Bu makale birinci yazarın Yüksek Lisans tezinin (FYL-2014-3272) bir bölümüdür. *This paper is a part of first author's MSc thesis.*

\*\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author;*

✉ tcabar@cu.edu.tr, ☎ (+90) 322 338 6997, 📠 (+90) 322 338 6614

## GİRİŞ

Ülkemiz dünya bağcı ülkeler arasında bağ alanı bakımından 497 000 ha'lık alan ile 5. sırada, üretim bakımından ise 3.6 milyon ton yaş üzüm üretimiyle 6. sıra yer almaktadır (1). Yıllık üretilen yaş üzümün büyük bir kısmı sofralık ve kurutmalık olarak değerlendirilirken şaraba işlenen miktar TÜİK rakamlarına göre %11 civarındadır (2).

Elazığ ve çevresi ülkemizde bulunan önemli bağ bölgelerinden birisidir. Bölgede kaliteli şaraplık üzüm yetiştirilmektedir. Yoğun olarak yetiştirilen şaraplık üzümler Öküzgözü ve Boğazkere'dir. Yörede Öküzgözü ve Boğazkere dışında ulusal ölçekte tanınmayan bazı yerli çeşitler de bulunmaktadır. Bunlardan birisi de Kösetevek üzüm çeşididir. Bu çeşit kırmızı şaraplık siyah bir çeşit olup özellikle Elazığ'ın Kuzova Bölgesinde yetiştirilmektedir. Kösetevek üzümünün taneleri orta büyüklükte ve elipsoidal şekilli, meyve eti renkli ve sulu bir üzüm çeşididir. Genel olarak Öküzgözü şarabı ile kupaj yapılarak değerlendirilir. Siyah bir üzüm çeşidinden kaliteli kırmızı şarap üretebilmek için; üzüm iyi renk verebilmeli, yeterli şeker miktarına, tanen miktarına, asit miktarına, kaliteli aroma potansiyeline sahip olmalı ve şıra verimi yüksek olmalıdır.

Üzümün bileşimini belirleyen önemli faktörlerden biri de üzümlerin olgunluk durumudur. Üzüm asma üzerinde belli bir sürede olgunlaşır. Olgunlaşma süresince üzümün bileşimi değişir. Üzümlerde renk dönüşümünden itibaren olgunluk kontrolleri yapılmaya başlanır ve elde edilmek istenen şarap tipine göre en uygun bileşime ulaştıkları zaman bağbozumu yapılır. Bağbozumunun zamanında yapılması elde edilecek şarabın kalitesi bakımından çok önemlidir (3, 4).

Bu çalışmanın amacı Kösetevek üzüm çeşidinin kalite kırmızı şarap üretimi için çeşit özelliklerini ve şaraplık özelliklerini belirlemektir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

#### *Hammadde ve Bağın Konumu*

Araştırmada Elazığ ili Kuzova Bölgesinin Koruk köyünde 2014 yılı bağbozumundan elde edilen Kösetevek üzümleri kullanılmıştır. Üzümlerin kullanıldığı bağ Keban barajına 3 km uzaklıkta, 9250 m<sup>2</sup>'lik bir alanda, doğu-batı yönünde

uzanmakta olup 1062-1074 rakımda bulunmaktadır. Bölgenin toprak yapısı tınlı, kumlu, killi-tınlı ve orta kalkerlidir. Bölgenin kıraç, taşlık yamaç arazili olması şarap bağcılığı için elverişli koşulları sağlamaktadır. Bölgenin sert karasal iklimi 1974 yılında Keban barajının kurulmasıyla daha ılımanlaşmıştır. Keban barajı bölgedeki şaraplık üzüm kalitesini daha üst seviyeye taşımakta etkili olmuştur.

### Yöntem

#### *Üzüm Örneklerinin Alınması*

Elazığ-Kuzova bölgesi koşullarında Kösetevek çeşidinin fenolojik özellikleri uyanma, çiçeklenme, ben düşme ve olgunluk Nisan ayından itibaren gözlenmiştir. Üzüm örneklerinin alımı, ben düşme aşamasından bağbozumu aşamasına kadar 15 günde bir, Kelebek'e (5) göre yapılmıştır.

#### *Üzümde Yapılan Analizler*

Üzüm örneklerinde önce salkım ağırlığı, salkım en ve boyu ile tane sayısı belirlenmiş, daha sonra taneler salkımdan ayrılarak sap-çöp ağırlığı ve sap/salkım oranı bulunmuştur. Salkımlardan ayrılan taneler bir kaptan toplanmış ve 250 adet üzüm tanesi gelişigüzel seçilerek tanenin yapısı ve tanede kabuk, çekirdek ve pulp (meyve eti) oranı belirlenmiştir. Üzüm ve şıradan SÇKM, toplam asitlik, öksele, pH ve indirgen şeker analizleri yapılmıştır (6).

Ayrıca üzümde bisülfid yöntemiyle toplam antosiyanin ve toplam fenolik bileşikler indisi (A280) analizi yapılarak üzüm kabuğunda bulunan toplam antosiyanin miktarı (ApH1), üzüm kabuğunda bulunan çözünebilir antosiyanin miktarı (ApH<sub>3,2</sub>), antosiyaninin çözünebilirlik indisi (%EA), kabuğun tanen bileşimi indisi (dpell), kabuk taneninin olgunluğu (%dpell), çekirdeğin tanen bileşimi indisi (dtpep) ve çekirdeğin tanen olgunluğu (%Mp) belirlenmiştir (5, 7).

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

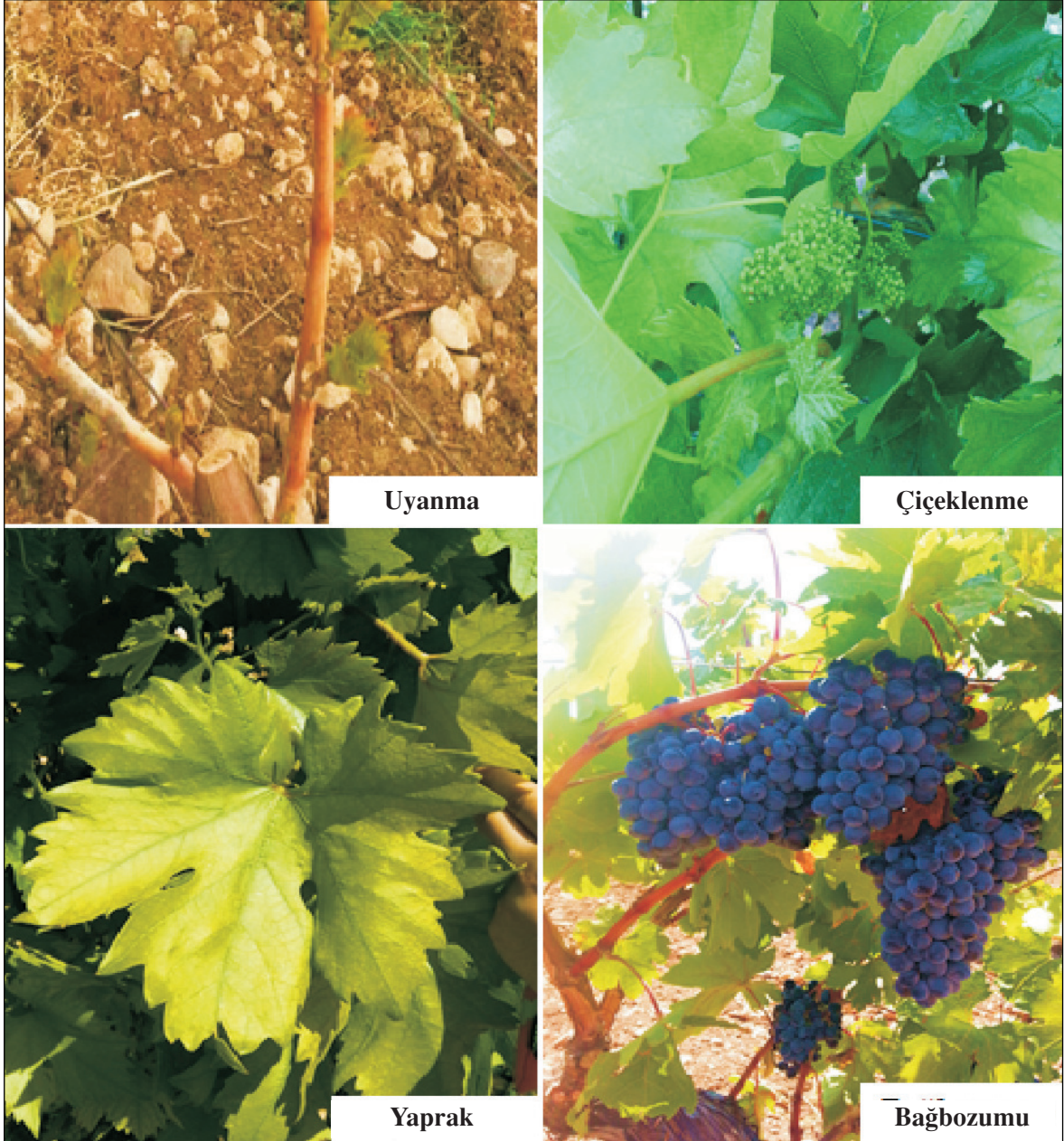
### **Kösetevek Üzümünün Fenolojik Özellikleri ve Olgunluğun Gidişi**

Omcanın fenolojik dönemleri uyanma, tam çiçeklenme, ben düşme ve olgunluktur. Kösetevek omcaları için Nisan ayından itibaren fenolojik dönemler haftalık yapılan incelemelerle

gözlemlenmiştir. Kösetevек üzümünün 2014 yılı fenolojik dönemlerine ait resimler Şekil 1'de verilmiştir. Kuzova bağında uyanma Nisan'ın ilk haftası, tam çiçeklenme Mayıs'ın 2. haftası, ben düşme Ağustos'un ilk haftası ve olgunluk Eylül'ün 2. haftasında gerçekleşmiştir. Bölgeye göre Kösetevек çeşidi için gözlemlenen bu dönemler her yıl iklime bağlı olarak birkaç gün sapma gösterebilmektedir.

Kösetevек üzümünün olgunluk takibi Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelgeden de görüldüğü üzere üzümde olgunluk süresince ortalama salkım ağırlığı, salkım-tane boyutu ve ağırlığı olgunluk ilerledikçe artış göstermiştir. Olgunluktaki ilerlemeye bağlı olarak ŞÇKM miktarı artmış ve toplam asitlik azalmıştır.



Şekil 1. Kösetevек üzümünün fenolojik dönemlerine ait görüntüler  
Figure 1. Images belong to phenological periods of Kösetevек grape variety

Çizelge 1. Kösetevek üzümünün olgunluk takibi  
Table 1. Monitoring of Kösetevek grape maturity

	01.08.2014	16.08.2014	31.08.2014	15.09.2014
Salkım ağırlığı(g) <i>Bunch weight</i>	227.5±37.3	265.77±104.55	283.4±6.8	317.42±97.23
Salkım eni (cm) <i>Bunch width</i>	11.92±2.81	14±3.46	14.53±3.89	15.1±2.32
Salkım boyu (cm) <i>Bunch length</i>	12.3±2.84	15.54±1.98	17±2.0	18.5±1.96
Tane eni (cm) <i>Berry width</i>	0.89±0.14	1.00±0.18	1, 11±0.11	1.13±0.18
Tane boyu (cm) <i>Berry length</i>	1.1±0.15	1.23±0.17	1.26±0.11	1.35±0.11
100 tane ağırlığı (g) <i>100 berry weight</i>	110.15	138.4	189.2	216.09
SÇKM TSS	9.9	15.9	21.1	23.0
Toplam asitlik (g/L)* <i>Total acidity</i>	24.5	8.1	5.21	5.1
pH	3.06	3.39	3.70	3.70

\*Tartarik asit cinsinden (*as tartaric acid*).

### Kösetevek Üzümünün Salkım ve Tane Yapısı

Kösetevek üzümünün salkım ve tane yapısı üzerine yapılan analizlerle ilgili değerler Çizelge 2'de verilmiştir.

Üzümlerin salkım ve tane yapısı, elde edilen şıra ve şarapların bileşimini etkilediği için teknolojik yönden önemlidir (8, 9). Üzüm salkımı çöp ve tanelerden oluşur. Çöpler üzüm çeşidine göre salkım ağırlığının %2-6'sını oluşturur (9). Çizelge 2'de görüldüğü gibi üzümlerin salkım ağırlığı 317.4 g ve salkım boyu 18.5 cm olarak bulunmuştur. Üzümler üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda salkım ve tane yapısının iklim koşulları, bakım durumu ve toprak gibi çeşitli etmenlere bağlı olarak yıllara göre değiştiği bildirilmiştir (10).

Kösetevek üzümünün 100 tane ağırlığı 216 g, tane eni 11.3 mm, tane boyu 13.5 mm, tane ağırlığı 2.1 g olarak bulunmuştur (Çizelge 2). Kösetevek üzüm çeşidi bölgenin önemli şaraplık çeşidi olan Öküzgözü üzümüyle kıyaslandığında tanelerinin

daha küçük ve hafif olduğu belirlenmiştir. Kösetevek üzüm tanesinde ortalama 1 ya da 2 tane çekirdek bulunmaktadır.

Üzüm taneleri ise kabuk, pulp (meyve eti) ve çekirdekten oluşur. Kabuklar, çeşitlere göre, toplam tane ağırlığının %5-21'ini oluşturur. Genellikle şaraplık çeşitlerde tanenin sert kabuklu ve sulu olması istenir (9). Şeker ve asit içeriği bakımından üzümün en önemli kısmı olan pulp (meyve eti) tanenin %80-85'ini oluşturur (11). Çekirdekler, çeşitlere göre, tanenin %2.5-10 kadarını oluşturur (9). Çizelge 2'de görüldüğü gibi, Kösetevek çeşidinin pulp oranı %82.2 olarak bulunmuştur. Denemelerde kullanılan Kösetevek üzüm çeşidinde pulp oranının yüksek çekirdek oranının az olması olumlu bir özelliktir. Pulp miktarının yüksek olması şıra verimi bakımından olumlu bir özelliktir (9). Denemelerde kullanılan Kösetevek üzümünün kabuk oranı %14.6'dır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Kösetevek üzümünün salkım ve tane yapısı  
Table 2. Berry and bunch structure of Kösetevek grape

Salkım ağırlığı (g) <i>Bunch weight</i>	317.42±97.23
Sap-çöp ağırlığı (g) <i>Stalk weight</i>	9.11±4.91
Sap/Salkım oranı (%) <i>Stalk/bunch rate</i>	3.42±3.91
Salkım eni (cm) <i>Bunch Width</i>	14.53±3.69
Salkım boyu (cm) <i>Bunch length</i>	12.3±2.84
Tane sayısı (adet) <i>Numbers of berry</i>	160
Tane eni (mm) <i>Berry width</i>	1.13±0.18
Tane boyu (mm) <i>Berry length</i>	1.35±0.11
100 Tane ağırlığı (g) <i>100 Berry weight</i>	216
Tane ağırlığı (g) <i>Berry weight</i>	2.1
Çekirdek sayısı (adet/100 tane) <i>Number of seeds</i>	150
Kabuk (%) <i>Skin</i>	14.6
Çekirdek (%) <i>Seed</i>	3.2
Pulp (%) <i>Pulp</i>	82.2

### Kösetevек Üzümünün Bileşimi

Kösetevек üzümünün olgunluk durumu ve bileşimi Çizelge 3'te verilmiştir. Üzümlerde olgunluğun izlenmesindeki amaç, üzümlerin işlenecek şarap tipine en uygun bileşime ulaştıkları anı belirlemek, diğer bir deyişle bağbozumu zamanını saptamaktır. Çünkü şarap yapımında hangi yöntem uygulanırsa uygulansın, elde edilecek şarabın kalitesini etkileyecek en önemli faktör hammaddenin bileşimidir (9).

Üzümlerin olgunlaşma zamanı çeşide, iklim ve çevre koşullarına göre değişir. Olgunluk durumunu belirlemek için, şeker ve asit miktarını değişik şekilde ifade etmek ve bunlar arasında değişik oranlar kurmak suretiyle, çeşitli olgunlaşma katsayıları elde edilmiştir (12). Üzümün olgunluk durumu, şeker ve asit oranını temel alan, öksele/asit (g/L) oranı kullanılarak belirlenmektedir (4, 13). Canbaş ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada Öküzgözü üzümünün olgunlaşma katsayısını 1998 yılında 10.8 ve 1999 yılında 13.1 olarak belirlemişlerdir. Canbaş ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada Öküzgözü üzümünün olgunlaşma katsayısının 10.1 ile 15.3 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (14, 15). Kösetevек üzümünün olgunluk katsayısı şeker ve asit oranını temel alan öksele/asit (g/L) oranı kullanılarak 19.2 bulunmuştur. Bu oranın büyük olmasının temel nedeni Kösetevек üzümünün asitliliğinin düşük olmasıdır.

Kösetevек üzümünün toplam asitliği tartarik asit cinsinden 5.1 g/L olarak bulunmuştur. Amerine ve ark. (1980), şaraplık üzümlerin sıralarında asitliğin (tartarik asit cinsinden) litrede 3-15 g arasında değiştiğini bildirmişlerdir (16). Kösetevек üzümlerinin pH değeri 3.7 olarak bulunmuştur.

Üzümlerde bulunan başlıca şekerler glikoz ve fruktozdur, şeker indirgen şeker veya SÇKM olarak da ifade edilebilir (17). Kösetevек şırasının

indirgen şeker miktarı 227.3 g/L ve SÇKM'si 23.0 briks olarak bulunmuştur. Boulton ve ark. (1996), kalite kırmızı şaraplık üzümlerin sıralarında şekerin 205-230 g/L ve SÇKM'nin 20.5 ile 23.5 briks ve asitliğin tartarik asit cinsinden 6.5-7.5 g/L arasında olması gerektiğini belirtmişlerdir (18). Kösetevек şırasının şeker miktarı gerekli alkolü verecek düzeydedir bu da pozitif bir özelliktir. Ancak toplam asit miktarı beklenenden düşüktür.

### Kösetevек Üzümünde Fenolik Bileşiklerin Olgunluk Durumu

Üzümlerdeki fenolik bileşiklerin en uygun bileşime ve çözünürlüğe ulaştığı anı belirlemek amacıyla fenolik bileşiklerin olgunluk analizleri yapılmıştır. Kösetevек üzümlerinde fenolik bileşiklerin olgunluk analiz sonuçları Çizelge 4'de verilmiştir. Kösetevек üzümlerinde yapılan olgunluk analizlerinde toplam fenolik bileşik indisi (A280) 56.4, toplam antosiyanin miktarı 912.1 mg/L, çözünebilir antosiyanin miktarı 503.8 mg/L, antosiyaninin çözünebilirlik indisi (%EA) 44.8, kabuğun tanen bileşimi indisi (dpell) 10.07, kabuk tanenin olgunluğu (%dpell) 17.8, çekirdeğin tanen bileşimi indisi (dtpep) 46.3 ve çekirdek tanenin olgunluğu (%Mp) 55.3 olarak hesaplanmıştır. Ribéreau-Gayon ve ark. (2000), üzümlerde çözünebilir antosiyanin miktarının çeşide ve olgunluk durumuna bağlı olarak 500-2000 mg/L arasında değiştiğini ve 20-70 arasında değişen antosiyaninin çözünebilirlik indisi (%EA)'nin olgunluğa paralel olarak azaldığını açıklamışlardır. Değerin düşük olması antosiyaninlerin kolay çözünebildiğini göstermektedir (7). Çekirdek tanenin olgunluk değeri (%Mp) de, üzüm çeşidine ve çekirdek sayısına göre 0-60 arasında değişmektedir. Bu değer yüksek olması çekirdekte tanenin fazla olduğunu gösterir. Çekirdek tanenin yüksek olması şarabın lezzeti üzerinde negatif bir etki riskini arttırabilir.

Çizelge 3. Üzümün Olgunluk Durumu ve Şırasının Bileşimi  
Table 3. The maturation state and composition of grape juice

Bağbozumu tarihi <i>Vintage date</i>	15 Eylül 2014
Öksele derecesi <i>Oechsle degree</i>	98±0.00
Toplam asit (g/L)* <i>Total acidity</i>	5.1±0.20
Olgunlaşma katsayısı (öksele/Toplam asit**) <i>Maturity index Oechsle /total acidity</i>	19.2
SÇKM (briks) <i>TSS, brix</i>	23.0±0.00
pH <i>pH</i>	3.7
İndirgen şeker (g/L) <i>Residual sugar</i>	227.3±2.40
Şıra verimi (%) <i>Yeald of grape juice</i>	70

\*Tartarik asit cinsinden (*as tartaric acid*), \*\*g/L



Çizelge 4. Üzümde Fenolik Bileşiklerin Olgunluk Durumu\*  
Table 4. Phenolic maturity state of Kösetevek grape

Toplam fenolik bileşik indisi (A280) <i>Total phenolic compound index</i>	56.4
Toplam antosiyanin miktarı (ApH1)(mg/L) <i>Total anthocyanin</i>	912.1
Çözünabilir antosiyanin (ApH3, 2)(mg/L) <i>Extractable anthocyanin content</i>	503.8
Antosiyaninin çözünabilirlik indisi (%EA) <i>Anthocaynin extractability index</i>	44.8
Kabuğun tanen bileşimi indisi (dpell) <i>Skin tannin index</i>	10.07
Kabuk taneninin olgunluğu (%dpell) <i>Maturity of skin tannin</i>	17.8
Çekirdeğin tanen bileşimi indisi (dtpep) <i>The composition of seed tannin index</i>	46.3
Çekirdek tanenin olgunluğu (% Mp) <i>Maturity of seed tannin</i>	55.3

\*Her bir değer in standart sapması %10' nun altındadır. *SD of each data is under 10%*

Kelebek (5) tarafından Elazığ'da yetiştirilen Öküzgözü üzümünün ve bu üzümde elde edilen şarabın fenolik bileşikleri profili üzerine yapılan araştırmada Öküzgözü'nün olgunluk analizlerinde toplam fenolik bileşik indisi (A280) 37.4-56.2, toplam antosiyanin miktarı 876.9-1064 mg/L, çözünabilir antosiyanin miktarı 460.8-527.6 mg/L, antosiyaninin çözünabilirlik indisi 47.4-50.4, kabuğun tanen bileşimi 18.4-21.1 çekirdeğin tanen bileşimini 18.9-53.0 ve çekirdek taneninin olgunluğu 50.7-62.6 olarak bildirilmiştir (5). Kösetevek üzümünün olgunluk anında fenolik bileşiklerinin durumu Öküzgözü üzümüyle benzerlik göstermektedir.

## SONUÇ

Bu çalışmada Elazığ ilinin Kuzova bölgesinde yetiştirilen yerli siyah üzüm çeşidi olan Kösetevek üzümünün fenolik, olgunluk özellikleri, üzümün bileşimi ve kırmızı şaraba uygunluğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Üzümün kalite şarap üretimine uygunluğunu belirlemek için üzümde şeker, asit, fenolik bileşiklerin olgunluk durumu analizleri yapılmıştır. Kösetevek üzümünün olgunluk anında tane ağırlığının 2.1 g, tanesinin orta büyüklükte koyu mor renkte ve sıkı tane yapısında olduğu, yörede erken olgunlaştığı, şeker miktarının 227.3 g/L, asit miktarının 5.1 g/L ve pH'sının 3.7 olduğu belirlenmiştir. Üzümde toplam fenolik bileşik indisi 56.4 ve toplam antosiyanin 912.1 mg/L bulunmuştur. Kösetevek üzümü genel olarak değerlendirildiğinde, toplam asit miktarının beklenenden düşük olduğu ancak renk potansiyeli, fenolik bileşikler, sıra verimi ve şeker miktarı bakımından kalite kırmızı şarap üretimi için uygun bir çeşit olduğu saptanmıştır. Kösetevek üzümünün şaraba işlenmesi sırasında düşük asitliğin giderilmesi için asit ilavesi veya

işleme sırasında koruk ilavesi yapılabilir veya Kösetevek şarabı yörede üretilen Öküzgözü şarabı ile kupaj yapılarak üretilebilir.

## KAYNAKLAR

1. Anon, 2016. World Vitiviculture Situation. International Organisation of Vine and Wine (OIV) Statistical Report on World Vitiviculture, Paris.
2. Anon, 2015. Türkiye İstatistik Kurumu. [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001) (Erişim tarihi: 18 Kasım 2016).
3. Gomez E, Martinez A, Barron L.J.R, Diez C. 1995. Chance in Volatile Compounds During Maturation of Same Grape Varieties, *J Sci Food and Agric*, 51, (337-343) s.
4. Deryaoğlu A, 1997. Elazığ Yöresinde Yetişen Siyah Şaraplık Boğazkere ve Öküzgözü Üzümlerinin Olgunlaşması Sırasında Meydana Gelen Fiziksel ve Kimyasal Değişmeler. Ç.Ü. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana, (148) s.
5. Kelebek H, 2009. Değişik Bölgelerde Yetiştirilen Öküzgözü, Boğazkere ve Kalecik Karası Üzümlerinin ve Bu Üzümlerden Elde Edilen Şarapların Fenol Bileşikleri Profili Üzerine Araştırmalar. Ç.Ü. Fen Bilimleri Ens. Gıda Müh. Anabilim Dalı Doktora Tezi, Adana, (259)s.
6. Anon 2005. Community Methods for the Analysis of Wines, EEC No 2676/90. Office of Official Publications of the European Communities, (194) s.
7. Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieau, 2000. *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*. John Wiley and Sons Ltd., England, (450) s.

8. Amerine M.A, Berg H.W, Crues W.V, 1972. *The Technology of Winemaking*. The AVI Publishing Campnay, Inc, Vespport, Connecticut. Official Publications of the European Communities, (194) s.
9. Canbaş A, 1981. Üzümlerin Şaraplık Değerlerini Belirleyen Ölçütler. Türkiye I. Şarapçılık Sempozyumu 14-19 Eylül 1980, Tekirdağ.
10. Akman A, Topaloğlu F, Fidan I, 1971. Nevşehir ve Ürgüp Ekolojik Koşullarına Uygun Yerli ve Yabancı Şaraplık Üzüm Çeşitlerinin Şaraplık Değerleri Üzerinde Araştırmalar. Tübitak, TOAG Yayınları, No: 11, Ankara.
11. Navarre R, 1988. *L'Oenologie, Tec.&Doc.*, Lavoisier, Paris, (331) s.
12. Canbaş A, 1978. Nevşehir-Ürgüp çevresi Dimrit Üzümlerinden Daha iyi Kalitede Kırmızı Şarap Elde Etme Olanakları Üzerinde Teknolojik Araştırmalar. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Doçentlik Tezi, Adana, (138) s.
13. Canbaş A, 2006. *Şarap Teknolojisi Ders Notları (yayınlanmamış)*, Ç.Ü. Ziraat Fakültesi, Adana, (163) s.
14. Canbaş A., Cabaroğlu T, Erten H, Selli S, Bozdoğan A, 2002. Öküzgözü ve Boğazkere Üzümlerinden Elde Edilen Şaraplardaki Fenol Bileşikleri Üzerine Cibre Fermantasyonu Süresinin Etkisi (1998- 1999 Yılı Denemeleri), Tübitak-Togtag/Tarp-1858 nolu proje, Ankara.
15. Canbaş A, Cabaroğlu T, Erten H, Deryaoğlu A, Ünal Ü, Selli S, 2001. Öküzgözü ve Boğazkere Üzümlerinin ve Bunlardan Elde Edilen Şarapların Genel Özellikleri. Gap II. Tarım Kongresi, 24-26 Ekim, Şanlıurfa, (225-234)s.
16. Amerine M.A, Berg H.V, Kunke R.E, Ough C.S, Singleton V.L, Webb A.D, 1980. *The Technology of Wine Making*. The AVI Publsh. Company, Inc. Vespport, Connecticut, (797) s.
17. Akman A.V ve Yazıcıoğlu T, 1960. *Fermantasyon Teknolojisi, Cilt 2, Şarap Kimyası ve Teknolojisi*, A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 160, Ankara, (604) s.
18. Boulton R.B, Singleton V.L, Bisson L.F, Kunkee R.E, 1996. *Principles and Practises of Wine Making*, Chaman Hall, New York, (604) s.



## HALOFİLİK LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ÜRETTİĞİ HİDROLİTİK ENZİMLER

Sedef Yüce, Seda Tahtacı, Gülden Başyigit Kılıç\*

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur

Geliş tarihi / *Received*: 05.09.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / *Received in revised form*: 05.11.2016

Kabul tarihi / *Accepted*: 23.12.2016

Online baskı tarihi / *Published online*: 25.01.2017

### Öz

Halofilik laktik asit bakterileri (HLAB), tuz konsantrasyonu yüksek olan ortamlarda gelişen mikroorganizmalardır. Bu mikroorganizmaların tuzlu ortamlarda gelişebilmesi biyoteknolojinin çeşitli alanlarında kullanılma potansiyellerini arttırmaktadır. Enzimler endüstrinin hemen her alanında kullanılmaktadır ve genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikrobiyel enzimlerin endüstride kullanılmalarının bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre avantajları vardır. Bunlar; katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları, fazla miktarda elde edilebilmeleridir. Enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle biyoteknolojinin endüstriyel enzimler ile ilgili alanında yapılan çeşitli araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. HLAB tarafından üretilen enzimler farklı sektörlerde kullanım alanına sahiptir. Bu makalede endüstriyel alanda yaygın olarak kullanılan HLAB'tan elde edilen proteaz, amilaz, selülaz, ksilanaz, lipaz gibi enzimler hakkında bilgi verilmiş ve yapılan araştırmalardan örnekler sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Halofilik, laktik asit bakterileri, hidrolitik enzim

## THE HYDROLYTIC ENZYMES PRODUCED BY HALOPHILIC LACTIC ACID BACTERIA

### Abstract

Halophilic lactic acid bacteria (HLAB) are microorganisms that grow in environments with high salt concentration. The survivability of these microorganisms under salty environments increases their usage potential in various fields of biotechnology. Enzymes are used in almost in every field of industry and usually obtained from microorganisms. The use of the microbial enzymes in industrial process has several distinct advantages compared to the plant or animal derived enzymes. These advantages are; high catalytic activity, no formation of undesirable side products, more stability, less production cost and high enzyme production yield. Biotechnological research in the field of industrial enzymes is gaining more importance due to the development of enzyme technology, the diversity in the fields of product usage and high economical value. The enzymes which are produced by HLAB have many application areas in different industrial sectors. In this review article, information about enzymes such as lipases, xylanase, cellulase, amylase and protease obtained from HLAB is provided and the results of research in this area is presented and it has been presented some examples.

**Keywords:** Halophilic lactic acid bacteria, hydrolytic enzymes

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ gklic@mehmetakif.edu.tr,

☎ (+90) 248 213 2724,

☎ (+90) 248 213 2727

## GİRİŞ

Laktik asit bakterileri (LAB), gıda fermantasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu bakteriler üründe hem arzu edilen duyuşsal özellikleri geliştirmek, hem de mikrobiyolojik koruma sağlamak amacı ile kullanılırlar (1). LAB, karbonhidrat fermantasyonu sırasında son ürün olarak laktik asit üretmeleriyle tanımlanan Gram pozitif, fakültatif anaerob, katalaz negatif, hareketsiz, sitokromdan yoksun olup, bitki atıklarından, et ve süt ürünlerinden, sıcakkanlı canlıların sindirim sisteminden sıklıkla izole edilebilen bakterilerdir (2-4). LAB organik asit, antimikrobiyel bileşenler gibi pek çok faydalı bileşik ve organik bileşikleri parçalayabilen enzimler üretmektedir (5). Halofilik laktik asit bakterileri (HLAB) gelişmeleri için tuza (sodyum klorür) gereksinim duyan ve yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlarda canlılığını devam ettirebilen organizmalardır (6). Bu mikroorganizmalar halofilik ve halotolerant olarak sınıflandırılmıştır. Optimum %3 (w/v) tuz konsantrasyonunda gelişebilenler hafif halofilik, %3-15 (w/v) tuz konsantrasyonunda gelişme gösterenler orta halofilik, %25 (w/v) tuz konsantrasyonunda gelişme gösterenler ise aşırı halofilik mikroorganizmalar olarak sınıflandırılmaktadır (7). Halofiller tuza toleranslı olan enzimler için mükemmel bir kaynaktır. Aynı zamanda bu bakteriler yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde etkili olabilmektedir (8). Son zamanlarda halotolerant LAB mavi, Brie, Camembert ve Tilsiter gibi bazı olgunlaşmış peynirlerin dış yüzeyinde keşfedilmiştir (9).

Fermente ürünlerden izole edilen HLAB arasında en çok bulunan türler *Tetragenococcus* ve *Pediococcus* cinslerine ait olarak belirlenmiştir (10). Bunlar arasında *T. halophilus*, *T. muriaticus*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Lactobacillus plantarum* türleri fermantasyon aşamalarında sıkça bulunan türler olarak tespit edilmiştir.

Yapılan bu derleme çalışmasında HLAB hakkında bilgi verilmiş ve bu bakterilerin ürettikleri enzimler ile ilgili yapılmış çalışmalardan örnekler sunulmuştur.

## HALOFİLİK LAKTİK ASİT

### BAKTERİLERİNİN ÜRETTİĞİ ENZİMLER

Bir enzimin endüstriyel üretimde güvenilirlikle kullanılabilmesi için düşük maliyetli olması, farklı

alanlarda kullanılabilme imkânının bulunması ve toksik etkisinin olmaması önemlidir (11). Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbonhidratları parçalayan enzimler, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimlerin oluşturduğu belirtilmektedir. Karbonhidratları parçalayan enzimler grubuna giren  $\alpha$ -amilaz enzimi %13'lük oran ile önemli bir yer tutmaktadır (12). Günümüzde endüstriyel kaynaklı enzimlerin çoğu mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Mikrobiyal enzimler, bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre daha yüksek katalitik aktivite göstermeleri, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, stabilite özellikleri, ekonomik olmaları ve fazla miktarlarda elde edilebilme özellikleriyle üstünlük sağlamaktadır (12).

Endüstriyel uygulamalarda mezofilik ve termofilik organizmalar tarafından üretilen enzimler tercih edilmektedir. Ancak son zamanlarda, yüksek tuzlu ortamlarda gelişebilen mikroorganizmaların ürettiği halofilik enzimler ilgi çekmeye başlamıştır. Bu enzimler, zorlu endüstriyel koşullarda gösterdikleri yüksek aktivite, geniş substrat özgüllüğü ve kararlılıklarından dolayı deterjan katkılarında, biyoyakıt üretiminde, tekstil sanayisinde, atık arıtmada ve diğer birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaktadır (13).

### Lipaz

Lipaz, lipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalizleyen, esterazların bir alt sınıfını oluşturan enzim olarak bilinmektedir. Lipazların temel fonksiyonu, trigliseritlerin hidrolizini sağlamak olup aynı zamanda bu enzimler esterifikasyon, interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da katalize edebilmektedir. Lipazlar gıda, deterjan, ilaç, deri, tekstil, kozmetik ve kâğıt sektörlerinde yaygın olarak kullanılan enzimlerdir (14, 15).

Lipazlar, gıdaların fermantasyonu ve olgunlaşması aşamalarında önemli bir role sahiptir. Bu süreçlerin çoğunda tuzlama adımları mevcuttur (16). Gıda ürünlerinin hazırlanmasında fermantasyon sürecinde kullanılan lipazlar yüksek tuz konsantrasyonlarında aktif olmalı, bu amaçla halofil veya halotolerant enzimler kullanılmalıdır. Bu anlamda ekstrem mikroorganizmalardan izole edilen lipazlar endüstriyel işlemler için mükemmel bir alternatiftir (17). Bugüne kadar halofilik lipaz veya esterazlar ve onların uygulamaları konusunda sınırlı sayıda

araştırma yapılmıştır. Termofilik lipazlar halofilik lipazlara göre daha fazla dikkat çekmiştir. Ancak araştırmacıların biyoteknolojik uygulamalar için yeni ürün geliştirme çalışmaları ile halofilik organizmalar ve ürettikleri enzimler üzerine yapılan araştırmalar artmıştır (15, 18).

Halofilik yaşama özel uyum sağlayan bu mikroorganizma gruplarının lipolitik enzimleri biyoteknoloji gibi çeşitli alanlarda kullanım imkanına sahiptir (19). Endüstriyel işlemler genel olarak zor şartlar altında gerçekleştirildiğinden optimum pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonlarının doğru tespit edilmesi endüstriyel işlemler için önemlidir. Halofilik lipaz enzimleri de ekstrem şartlara uyum sağlama yeteneğinde oldukları için endüstriyel üretim için kullanılacak uygun enzimler grubunu oluşturmaktadır.

LAB içerisinde *Lactobacillus plantarum* endüstriyel olarak önemli bir türdür. Bu mikroorganizmanın yüksek tuz konsantrasyonlarında canlılığının, lipolitik ve esteraz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılmış farklı araştırmalar bulunmaktadır (20, 21). Anderson ve ark. (22) %5 NaCl konsantrasyonunda gelişebilen *L. plantarum* MF32 suşundan lipaz enzimini saflaştırmıştır. Yapılan başka bir çalışmada, Doğu Himalayaların geleneksel işlenmiş balık ürünlerinden izole edilmiş LAB'ın teknolojik ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı ürünlerden oluşan toplam 40 örneğin mikrobiyal çeşitliliği incelenmiştir. İzole edilen LAB'dan sadece 5 adedinde lipolitik aktivite tespit edilmiştir (23).

Meksika'da geleneksel olan Cotija ve doble crema peynirlerinden izole edilen halotolerant veya halofilik LAB'ın lipolitik, proteolitik aktiviteleri ve asit oluşturma kapasiteleri incelenmiştir. En yüksek proteolitik aktivite gösteren türler arasında *Tetragenococcus halophilus* ve *L. plantarum* belirlenmiştir. Lipolitik aktivite tayininde *T. halophilus*'un substratı hidroliz ederek lipolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek asit üretme yeteneğine sahip olan bakteri ise *L. pentosus* ve *L. plantarum*'dur (24).

Moreno ve ark. (17) tarafından yapılan bir çalışmada, aşırı halofilik bakteri olan *Salicola marasensis* IC10'un, salipro olarak adlandırılan ekstrasellüler proteaz ve LipL olarak adlandırılan lipaz ürettiği tespit edilmiştir. Lipolitik aktivitesi esas olarak sitoplazmik bölümde yer alan *S. marasensis* IC10'un farklı substratlarda aktivite

gösterebildiği saptanırken, en yüksek lipaz üretimi eksponansiyel fazın sonunda gerçekleşmiştir. 0-4 M NaCl ortamında enzim üretimi belirlenirken, en yüksek enzim aktivitesi 1 M NaCl içeren ortamda tespit edilmiştir.

Esteban-Torres ve ark. (21) ise *L. plantarum* WCF S1 suşundan Lp\_3562 proteininin klonlanıp, *E. coli* BL21 suşuna aktarılması ve bu proteinin biyokimyasal karakterizasyonu üzerinde çalışmıştır. Araştırmacılar Lp\_3562'nin tribütirin ve diğer uzun zincirli yapılarda lipaz aktivitesi gösterdiğini tespit etmiştir. Enzim pH 5-8 arasında aktivite gösterirken, en yüksek aktivite pH 7'de tespit edilmiştir. Lp\_3562 optimum lipaz aktivitesini 40°C'de gösterirken, buzdolabı sıcaklığında (5°C) maksimum aktivite % 40 olarak tespit edilmiştir.

### Amilaz

$\alpha$ -amilaz enzimi nişasta molekülündeki  $\alpha$ -1,4 bağlarını parçalayarak glukoz, maltoz, maltotrioz ve  $\alpha$ -limit dekstrinlerin oluşumunu sağlamaktadır. Nişasta çok sayıda glukoz molekülünün farklı şekillerde bağlanmasıyla oluşmuş polisakkarit özellikte bir bileşiktir. Bazı bakteriler ve mantarlar tarafından üretilen  $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -amilaz, glikoamilaz ve glikoizomeraz gibi enzimler nişastayı parçalama yeteneğine sahiptirler (25). Amilazlar biyoteknolojik açıdan enzimlerin önemli bir grubunu oluşturmaktadır. Klinik ve analitik kimyasalların yanı sıra nişasta sakkarifikasyon uygulamalarında ve yaygın olarak tekstil, gıda, bira ve damıtma endüstrilerinde halofil amilazlar kullanılmaktadır (26). Gıda endüstrisinde, nişastanın  $\alpha$ -amilaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucu açığa çıkan ürünler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu ürünlerden dekstrin, nişastanın glikoza kadar hidrolize olmasından önce oluşan kısa moleküllü ilk üründür.  $\alpha$ -amilaz enzimi ekmekçilikte ekmeğin bayatlamasını geciktirmesi ve raf ömrünü uzatmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Meyve suyu endüstrisinde de uygulanmakta olan enzim, elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır (27).

Nişasta molekülünün öncelikle  $\alpha$ -amilaz enzimi tarafından sıvılaştırılıp, daha sonra da ortama izoamilaz ve pullulanaz enzimlerinin ilavesi ile nişastanın maltoza kadar parçalanması sağlanmaktadır. Açığa çıkan maltoz, reçel, şekerleme, ekmek, bira üretiminde ve gıdalarda tatlandırıcı olarak da kullanılmaktadır. Nişastanın

hidrolizi sırasında yan ürün olarak açığa çıkan maltotetrozun ise nem tutucu olarak kullanılabilirdiği belirtilmektedir (28).

Thapa ve ark. (23), Doğu Himalayaların geleneksel işlenmiş balık ürünlerinden izole edilmiş 40 adet LAB'ın teknolojik ve fenotipik özelliklerini incelemişlerdir. İncelenen LAB türlerinin *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Pediococcus pentosaceus* ve *Weissella confusa*'ya ait olduğu belirlenmiştir. İzolatların proteaz, amilaz ve lipaz aktiviteleri araştırılmış, izole edilen bakterilerden 14 adedinde 1.5-5.8 U/mL amilaz aktivitesi belirlenmiştir. Bakterilerin çok düşük proteolitik aktivitelere sahip olduğu ve herhangi bir lipaz aktivitesi göstermediği belirlenmiştir.

Daha önceden 55°C'de faaliyet gösteren bir biyogaz pilot tesisinden izole edilmiş DNA izolatlarından oluşmuş metagenom kütüphanesinden termofilik mikroorganizmaların ürettiği yeni enzimlerin araştırılması için yapılmış bir çalışmada, izolatların amilazı parçalama yeteneği incelenmiş ve bir adet aktif amilaz üreten klon saptanmıştır. Amy13A geninin ise, yüksek seviyede rekombinant amilaz aktivitesi gösteren *Escherichia coli* içinde kodlandığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda Amy13A geninin yüksek konsantrasyonda tuzu ve yüksek sıcaklığı tolere edebilen birkaç enzimden biri olduğu ve ekstrem şartlarda gerçekleştirilecek nişasta işleme basamakları için potansiyel aday olduğu belirtilmiştir (29).

Pathak ve ark. (30) tarafından yapılan bir çalışmada ise tuzlu balık olan *Rastrelliger kanagurta*'da *Lactobacillus* spp. baskın türü oluşturmuştur. 8 izolattan 3 adedinin yeterli düzeyde amilaz ürettiği belirlenmiş ve Petri yüzeyinde amilaz üretiminde en yüksek zonü oluşturan türün ise *Lactobacillus yamanashiensis* olduğu belirtilmiştir.

### Proteaz

Proteazlar, hem fizyolojik hem de ticari alandaki uygulamaları açısından çok önemli bir yere sahip olan, proteinleri hidrolize eden enzimler olarak tanımlanmaktadır. Proteolitik enzimler proteinler arasındaki peptit bağlarının parçalanmasını katalize etmektedirler. Günümüzde proteazlar, dünyada endüstriyel olarak satılan üç büyük enzim

grubundan birini oluşturmaktadır. Proteazlar deterjan ve gıda endüstrisindeki uygulamalarda da geniş yer almaktadır. Proteazların geniş çeşitliliği bu enzimlerden fizyolojik ve biyoteknolojik alanlarda yararlanılmasını öne çıkarmıştır. Günümüzde artan talep doğrultusunda bitki ve hayvan kaynaklı proteazların yetersizliği mikrobiyel proteazlara olan ilginin artmasına yol açmıştır. Proteaz enzimi üretimi birçok bakteri ve küf türünde oldukça yaygındır. Biyoteknolojik uygulamalardaki arzu edilen karakteristik özelliklere sahip olmaları nedeniyle mikrobiyel kaynaklı proteazlar bitki ve hayvan kaynaklı proteazlara göre daha çok tercih edilmektedirler (31).

Mikrobiyel proteazlar, geniş pH aralıklarında aktivite göstermeleri sebebiyle asidik, nötral ve alkali olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır. Bununla birlikte *Bacillus* cinsinde yer alan çeşitli suşlar enzim endüstrisinde çok önemli bir yere sahiptirler (32). Özellikle nötr ve alkali olan çoğu ticari proteazın *Bacillus* cinsine ait bakteriler tarafından üretildiği belirtilmiştir. Orta düzeyde reaksiyon hızları nedeniyle nötral proteazlar gıda proteinlerinin hidrolizinde daha az acılık oluşturmaktadır. Bu enzimler sahip oldukları düşük sıcaklık toleransı sebebiyle gıda hidrolizlerinin kontrol aşamalarında avantaj oluşturmaktadırlar (33, 34).

Proteazların gıda endüstrisinde kullanılması eski çağlara dayanmaktadır. Peynir, ekmek yapımı, soya hidrolizatlarını hazırlama ve et tenderizasyonu (yumuşatma) gibi çeşitli alanlarda kullanılmakta olan proteazların süt endüstrisinde en çok uygulandığı alan ise peynir üretimidir. Sütü koagüle eden enzimler olarak rol oynayan mikrobiyal proteazlar dünyada buzağı rennetinin elde edilmesinin getirdiği sıkıntıyı giderecek alternatif oluşturmuştur (35). Süte özgü proteinazlar, rennet ve başlatıcı kültür olarak kullanılan LAB'ın proteolitik aktiviteleri ile gerçekleşen proteoliz süreci peynirin olgunlaşması için önemli bir olaydır (36, 37). Peynirin olgunlaşması sırasında meydana gelen biyokimyasal değişiklikler; pıhtılaştırıcı enzimler, doğal süt enzimleri, proteinazlar, lipazlar, başlatıcı kültürler ve ikincil mikroorganizmalar ve onların enzimleri gibi çeşitli enzimlerin sinerjik etkisi ile meydana gelmektedir. (38). Ekmek üretiminde ise proteazlar, hamurun yoğunluğunu azaltmak için, hamurda bütünlüğü sağlamak için, ekmekteki gluten gücünü düzenlemek için, doku kontrolünü ve tadı geliştirmek için ilave edilmektedir

(39). Proteazlar aynı zamanda tıbbi teşhis, ilaç, deterjan, bira sanayi ve biyomoleküler uygulamalarda kullanılmaktadır (40, 41).

Kanlayakrit ve Bovornreungroj (42) tarafından balık sosu örneklerinden tuz seven proteaz üreten bakterilerin izolasyonu ve karakterizasyonu amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise, izolasyon için Tayland'ın Doğu tarafında yer alan bazı balık sosu fabrikalarından alınan fermente balık örnekleri kullanılmıştır. Araştırmada 285 halofilik bakteri izole edilmiştir. İzole edilen suşlar arasında 10 tanesinin yüksek tuz seven proteaz üretme yeteneğinde olduğu belirlenmiştir. Bu suşlar, 4M NaCl içeren ortamda maksimum gelişme gösterip, proteaz üretirken, 2M gibi düşük NaCl konsantrasyonu içeren ortamda proteaz üretimi gerçekleştirilememiştir. En yüksek tuz seven proteaz üreten suşlar; Gram negatif, çubuk morfolojisine sahip olup, koloniler etrafında kırmızı renkli zon oluşumları ile karakterize edilmiştir. Thapa ve ark. (23)'nin çalışmasında ise, incelenen LAB izolatlarının proteaz, amilaz ve lipaz aktiviteleri araştırılmıştır. Bu izolatlar Doğu Himalayaların geleneksel işlenmiş balık ürünlerinden izole edilmiştir. İzole edilen bütün suşların 2 mm'den fazla zon çapı ile yaklaşık 0,5-1,3 U/mL arasında proteolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Udomsil ve ark. (43)'nin balık sosu püresinden proteinaz üreten HLAB izolasyonu yaptığı ve bu bakterilerin ürettiği uçucu bileşenlerini incelediği çalışmada, izole edilen 74 HLAB izolatından 7 tanesi %25 NaCl konsantrasyonunda gelişerek proteolitik aktivite göstermiştir. Çalışmada bütün izolatların Gram negatif kok şeklinde oldukları ve %0-25 NaCl konsantrasyonunda gelişebildikleri tespit edilirken, yapılan rRNA dizi analizine göre izolatlar *T. halophilus* olarak tanımlanmıştır.

### Fibrinolitik Enzimler

Fibrinolitik enzimler kemoterapötik ajan olarak kanın pıhtılaşmasında klinik uygulamalar için önemlidir. Aynı zamanda proteazın bir alt sınıfı olan fibrinolitik enzimler fibrin indirgeme yeteneğine sahiptir. Geçmiş yıllarda bu enzim genellikle kertenkeleler, solucanlar ve yılan gibi çeşitli hayvanlardan izole edilmekteydi (44). Günümüzde bu enzimlerin üretilmesi için bazı bakteriler ve mantarlar kullanılmaktadır. Fibrinolitik enzimler birçok araştırmacı için mükemmel bir kaynaktır. Bu enzim çeşitli fermente

gıdalarda, hayvanlarda, bitkilerde ve farklı mikroorganizmalarda bulunabilir (45). Bu enzim *in vivo* olarak sadece plazminojenden plazmine dönüşümü değil aynı zamanda trombin de hidrolize etmektedir. Özellikle Uzak Doğu ülkelerinde tüketilen farklı fermente gıdalarda fibrinolitik enzimler tespit edilmiştir. Shiokara fermente bir balık ürünüdür ve Japonya'da 1000 yıldan fazla süredir tüketilmektedir. Benzer şekilde tüketilen Douchi ise Çin'de üretilen fermente soya ürünüdür ve özel tat ve lezzetli olması nedeniyle birkaç bin yıldan daha eskiye uzanan bir geçmişe sahiptir (46).

Katsuwokinase Japon geleneksel tuzlu fermente gıdası olan kızıl orkinos 'Shiokara' da bulunan bir fibrinolitik enzimdir. Bu enzimin tuza karşı oldukça dayanıklı olduğu bulunmuştur (47). Endonezya'nın farklı alanlarında tüketilen geleneksel fermente balıklarda da Man Rogosa Sharpe (MRS) ve M17 agar besiyeri kullanılarak 74 halofilik LAB suşu izole edilmiştir. Bu bakterilerin proteolitik ve fibrinolitik aktiviteleri yağsız süt agar ve plazminojen içermeyen fibrin plaka kullanılarak belirlenmiştir. Bu izolatlardan 4 adeti fibrinolitik enzime sahipken, 25 adetinde ise proteaz aktivitesi belirlenmiştir (48).

Fibrinolitik enzim varlığı tespit edilen bazı türlerin bir Japon yemeği olan Natto, skipjack shiokara, bal mantarı olarak bilinen *Armillariella mellea*, Uzak Doğu'ya ait geleneksel ürün olan Kimçi, deniz ürünleri içeren fermente gıdalar ve soya fasülyesinden izole edilen mikroorganizmalar olduğu daha önceden yapılmış çalışmalarda belirlenmiştir (49, 50). Prihanto ve ark. (48) HLAB'ın proteolitik ve fibrinolitik enzim aktivitelerini incelediği çalışmada 70 adet izolat elde etmişlerdir. İzolatlardan 25 tanesi proteaz aktivitesi gösterirken, 4 tanesi de fibrinolitik enzim üretme yeteneği göstermiştir. Bunlar arasında *Bacillus coagulans* TB1 suşu en yüksek proteolitik ve fibrinolitik enzim üretme yeteneği göstermiştir.

### Dekarboksilaz

Biyogen aminler; hayvan, bitki ve mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucunda, amino asitlerin dekarboksilasyonu veya aldehit ve ketonların aminasyonu ve transaminasyonu ile oluşan düşük molekül ağırlıklı azotlu bileşiklerdir (51). Biyogen aminler gıdalardaki aminoasitlerin, bazı mikroorganizmaların dekarboksilaz enzimleri ile

dekarboksilasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Biyojen amin oluşumu ortamın pH'sını yükselterek mikroorganizmayı asidik ortam etkisinden korumaktadır. Birçok araştırmayla, farklı bakteri suşlarının biyojen amin ürettiği ortaya konmuştur. Histamin, tiramin, triptamin, serotonin, putresin, kadaverin, oktopamin, dopamin, agmatin, spermin, spermidin, diaminobutan ve feniletilamin, çeşitli çalışmalar ile gıdalarda tespit edilmiş önemli biyojen aminler olarak gösterilebilir (52). Gıdalarda yüksek derecede bulunan biyojen aminlerin, insanlarda önemli sağlık tehlikesi yaratabileceği düşünülmektedir (53).

Kimura ve ark. (54) ve Konagoya ve ark. (55) Japon fermente kalamar karaciğer sosundan *T. muriaticus* izole etmiş ve bakteride histidin dekarboksilaz aktivitesi tespit edilmiştir. Fermente deniz ürünlerinde histamin birikimine sebep olduğu bilinen *T. muriaticus* türünün histamin üreticisi olduğu belirlenmiştir. *T. muriaticus* türüne ait *T. muriaticus* a9 suşunun incelendiği bir başka araştırmada ise bu suşun histamin üretmediği tespit edilmiştir (56).

Kimura ve ark. (54) HLAB olan *T. muriaticus*'u balık sosundan izole ederek histamin oluşumunu araştırmıştır. *T. muriaticus*'un düşük asitte (pH 5.8) ve optimum %5-7 NaCl konsantrasyonunda histamin ürettiği gözlemlenmiştir. Balıkta histamin varlığı bakteriyolojik olarak bozulmaya neden olduğu için kimyasal bir indeks olarak kabul edilmektedir. (57).

Tayvan'da satılan 33 adet tuzlu uskumruda histamin ve histamin oluşturan bakterilerin varlığını belirlemek için yapılan bir incelemede, tüm örneklerdeki 9 biyojen aminin her biri ortalama 30 ppm düzeyinde tespit edilmiştir. Toplanan 18 örnekten ikisinde 70.1 ve 120.2 ppm düzeylerinde histamin üretimi belirlenerek, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin önerdiği limit olan 50 ppm'den daha fazla biyojen amin üretimi tespit edilmiştir (58).

### **Pektolitik Enzimler**

Pektinazlar evlerde kullanılan ilk enzimlerdir. İlk ticari uygulamaları şarap ve meyve suyunda kullanılmalarıdır. Pektinazlar meyve ve tekstil sektörünün yanı sıra çeşitli biyoteknolojik uygulamalar için son derece önemlidir. Aynı zamanda mikrobiyal kaynakların pektinaz

üretiminde önemli bir işlevi vardır (59). Pektolitik enzimler gıda işleme, sanayi ve alkollü içecek endüstrisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu enzimler pektini indirgeyerek çözeltinin viskozitesini azaltır. Pektolitik enzimler esas olarak bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir (60). Yapılan literatür taramasında HLAB'ın ürettiği pektolitik enzimler ile ilgili yapılmış sınırlı sayıda araştırmaya ulaşılmıştır.

Vidhyasagar ve ark. (61)'nin yaptığı çalışmada *P. pentosaceus* VJ13, VJ41, VJ56, *L. plantarum* ssp. *argentoratensis* SJ6, SJ35, SJ37, SJ40 ve *L. pentosus* SJ65 suşlarında Kongo kırmızısı ile yüksek pektinaz varlığı tespit edilmiştir. Pektinaz üretimi diğer izolatlarla karşılaştırıldığında *P. pentosaceus* VJ41 (306±6 U/mL) ve *L. pentosus* SJ65 (338±6 U/mL) suşlarında belirlenmiştir.

### **Ksilan ve Ksilanazlar**

Ksilan,  $\beta$ -1,4 bağları ile bağlanmış ksilopiranosil birimlerinden oluşan bitki hücre duvarlarının ana bileşenidir ve doğada en çok bulunan ikinci polisakkarittir. Ksilan, hemiselülozun yapısında mannan, galaktan ve arabinanın yanı sıra ana bileşen olarak yer alır. Selüloz ve lignin ile beraber hemiselüloz yapısına katılan bir bileşen olarak bitki hücre duvarlarının ana kompozisyonunu oluştururlar. Ksilanın ya da hemiselülozun lignin ve selüloz arasına yerleşmesi selülozun bütünlüğünün devamı ve selüloz degradasyonuna karşı liflerin korunması açısından önemlidir (62). Ksilan çok karmaşık bir moleküldür. Bu nedenle ksilanın hidrolizi için farklı enzimlere ihtiyaç duyulur. Ksilan molekülünün hidrolizini gerçekleştiren enzimlerin tamamına "ksilanolitik enzim sistemi" denir.  $\beta$ -1,4-endoksilanaz,  $\beta$ -ksilozidaz,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidaz,  $\alpha$ -glukuronidaz, asetil ksilan esteraz ve fenolikasit (ferulik ve p-kumarik asit) esteraz enzimleri bu bahsedilen enzim sistemi içinde yer almaktadır (63). Bu enzimler özellikle kağıt ve kağıt hamuru başta olmak üzere gıda ve hayvan yemi endüstrisi alanlarında temel endüstriyel enzim olmaları sebebiyle çok büyük öneme sahiptir. Ksilanazlar tek hücre proteini, enzimler, sıvı ya da gaz yakıtların üretimi, çözücüler ve şeker şuruplarının üretimi gibi genel uygulamalarda kullanılmaktadır (62).

Wejse ve ark. (64), halofilik bakteriden iki adet ekstrem halotolerant ksilan enzimi üreterek karakterizasyonunu yapmışlardır. Moleküler ağırlığı

43 ve 62 kDa olan iki alt birimden meydana gelmiş ksilanaz-1 optimum aktivitesini pH 6.0 ve 60°C'de göstermektedir. Ksilanaz-2 ise optimum 65°C ve 4 M NaCl'de etki göstermektedir. Enzimlerin yarılanma ömürleri 60°C'de 97 ve 192 dakika olarak belirlenmiştir.

WainQ ve Ingvorsen (65), ekstrem halofilik arkeon *Halorhabdus utahensis*'den β-ksilanaz ve β-ksilozidaz üretimi gerçekleştirmişlerdir. Her iki enzim de % 0-30 arasında NaCl konsantrasyonu gibi geniş bir aktivite spektrumuna sahip olup kısmen de olsa termofilik özelliktedirler. Enzimlerden β-ksilanaz 55°C ve 70°C olarak iki optimum aktivite sıcaklığına sahiptir. β-ksilozidazın optimum sıcaklığı 65°C'dir. Yapılan literatür taramasında HLAB'ın ürettiği ksilan ve ksilanaz enzimleri ile ilgili yeterli sayıda çalışmanın bulunmadığı gözlenmiştir

### SONUÇ

HLAB'ın, teknolojik özellikleri sayesinde gıda endüstrisinde önemli oldukları bilinmektedir. Gıdalarda bulunan HLAB, tuz içeriği yüksek fermente gıdalarda görülen baskın mikroorganizmalar olmaları sebebiyle, aroma ve lezzet gelişiminde başlatıcı veya destek kültür olarak rol oynamaktadır. HLAB tarafından üretilen hidrolitik enzimler farklı sektörlerde kullanıldıkları gibi çeşitli özellikleri de bulunmaktadır. Tuza dayanıklı enzimler, yiyecek, fermantasyon ve temizlik sektörü gibi yüksek NaCl konsantrasyonları ya da aseptik koşullar gerektiren birçok üretim süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. Değişik kaynaklardan elde edilen enzimler unlu mamullerin üretiminde, meyve suyu, şarap, süt ürünleri ve nişasta gibi gıda sektöründe kullanılmaktadır. Gıda kaynaklarından izole edilen HLAB'dan elde edilecek enzimler endüstriyel uygulamalarda ticarileştirme potansiyeline sahiptir. HLAB'ın ürettiği invertaz enzimi hakkında sınırlı bilgiye ulaşılmıştır. Özellikle HLAB tarafından üretilen bu enzim üzerinde yapılacak çalışmalara önem verilmesi gerekmektedir. Ayrıca enzim teknolojisinin giderek gelişmesi, ürünlerin kullanım alanlarının çeşitliliği ve ekonomik değerinin çok yüksek olması nedeniyle, endüstriyel enzimlerle ilgili yapılacak çeşitli çalışmaların enzimlerin üretiminde önemli olacağı düşünülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Salvucci E, LeBlanc J.G, Perez G. 2016. Technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw cereal material. *LWT - Food Sci Technol*, 70, 185-191.
2. Yüksekdağ Z.N, Beyatlı Y. 2009. Bazı laktik asit bakterilerinin fizyolojik, biyokimyasal, plazmit DNA ve protein profil özelliklerinin incelenmesi. *GIDA*, 34 (2): 91-98.
3. Başyigit Kılıç G, Kuleaşan H, Eralp İ, Karahan A.G. 2009. Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. *LTW-Food Sci Technol*, 42, 1003-1008.
4. Sağdıç O, Öztürk İ, Cankurt H, Tornuk F. 2011. Interaction between some phenolic compounds and probiotic bacterium in functional ice cream production. *Food Bioprocess Tech*, DOI 10.1007/s11947-011-0611-x.
5. Hayek S.A, İbrahim S.A. 2013. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: A Review. *Food Nut Sci*, 4, 73-87.
6. Roohi A, Ahmed I, Iqbal M, Jamil M. 2012. Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of Karak. *Pak J Bot*, 44, 365-370.
7. Surve V.V, Patil M.U, Dharmadekari S.M. 2012. Moderately halophilic bacteria from solar salt pans of Ribander, Goa: a comparative study. *Int J Adv Biotec Res*, 3, 635-643.
8. Gomes J, Steiner W. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol Biotechnol*, 42 (4) 223-235.
9. Ishikawa M, Kodama K, Yasuda H, Okamoto-Kainuma A, Koizumi K, Yamasato K. 2006. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Lett Appl Microbiol*, 44, 308-313.
10. Uchida M, Miyoshi T, Yoshida G, Niwa K, Mori M, Wakabayash H. 2014. Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria acting as a starter culture for sauce fermentation of the red alga Nori (*Porphyra yezoensis*). *J Appl Microbiol*, 116, 1506-1520.
11. Gurung N, Ray S, Bose S, Rai V. 2013. A Broader View: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine and beyond. Hindawi Publishing Corporation BioMed Res Int, Article ID 329121, p:8, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/329121>.



12. Alpan L.G. 2008. Bazı ekstrem termofil anaerobik bakterilerin alkali proteazlarının özelliklerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
13. Singh A.K, Mukhopadhyay M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Appl Biochem Biotechnol*, 166 (2): 486-520.
14. Houde A, Kademi A, Leblanc D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol*, 118 (1-3): 155-70.
15. Anisha C, Mathew J, Radhakrishnan E.K. 2012. Extracellular lipolytic enzyme production by a novel extremely halophilic bacterium. *Universal J Environ Res Technol*, 2 (3): 143-148.
16. Arroyo-López F.N, Romero-Gil V, Bautista-Gallego J, Rodríguez-Gómez F, Jiménez-Díaz R, García-García P, Querol A, Garrido-Fernández A. 2012. Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *Int J Food Microbiol*, 160, 42-49.
17. Moreno M.D.L, Pérez D, García M.T, Mellado E. 2013. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3, 38-51.
18. Schreck S.D, Grunden A.M. 2014. Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 1011-1021.
19. Ghasemi Y, Rasoul-Amini S, Kazemi A, Zarrini G, Morowvat M. H, Kargar M. 2011. Isolation and characterisation of some moderately halophilic bacteria with lipolytic activity. *Microbiol*, 80 (4): 483-487.
20. Kleerebezem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers O.P, Leer R, Turchini R, Peters S.A, Sandbrink H.M, Fiers M.W.E.J, Stiekema W, Lankhorst R.M.K, Bron P.A, Hoffer S.M, Nierop Groot M.S, Kerkhoven R, de Vries M, Ursing B, de Vos W.M, Siezen R.J. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (4): 1990-1995.
21. Esteban-Torres M, Manche J.M, Rivas B, Muñoz R. 2015. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT - Food Sci Technol*, 60 (1): 246-252.
22. Andersen H.J, Ostdal H. 1995. Partial purification and characterisation of a lipase from *Lactobacillus plantarum* MF32. *Food Chem*, 53 (4): 369-373.
23. Thapa N, Pal J, Tamang J.P. 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *Int J Food Microbiol*, 107 (1): 33-8.
24. Morales F, Morales I.J, Hernandez C.H. 2011. Isolation and partial characterization of halotolerant lactic acid bacteria from two Mexican cheeses. *Appl Biochem Biotechnol*, 164, 889-905.
25. Güven R.G. 2011. Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimler. *Elektronik Mikrobiyol Derg*, TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi), 09 (1): 1-10.
26. Pandey A, Nigam P, Soccol C.R, Soccol V.T, Singh D, Mohan R. 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol Appl Biochem*, 31 (2):135-52.
27. Şimşek T. 2006. Türkiye'nin değişik bölgelerinden termostabil alfa amilaz üreten *Bacillus* sp. türlerinin izolasyonu karakterizasyonu ve alfa amilaz geninin klonlanması. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
28. Tatar S. 2007. Termofil moderately halofilik *Bacillus* sp. suşlarından amilaz enzimi üretimi ve endüstriyel kullanım olanaklarının araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana.
29. Jabbour D, Sorger A, Sahm K, Antranikian G. 2013. A highly thermoactive and salt-tolerant  $\alpha$ -amylase isolated from a pilot-plant biogas reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97 (7): 2971-1978. doi: 10.1007/s00253-012-4194-x.
30. Pathak A.P, Sardar A.G, Janaj P.C. 2014. Exploring the salted fish for salt stable amylase producing bacteria. *Indian J Geo-Marine Sci*, 43(10): 1967-1971.
31. Kıran Eren Ö, Çömlekçioğlu U, Dostbil N. 2006. Bazı Mikrobiyal enzimler ve endüstrideki kullanım alanları. KSÜ Fen ve Mühendislik Derg, 9 (1): 12-18.
32. Adrio J.L, Demain A.L. 2014. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4, 117-139; doi:10.3390/biom4010117.
33. Qadar S.A.I, Shireen E, Iqbal S, Anwar A. 2009. Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3. *Indian J Biotechnol*, 18, 286-290.



34. Mushtaq Z, Irfan M, Nadeem M, Naz M, Syed Q. 2015. Kinetics study of extracellular detergent stable alkaline protease from *Rhizopus oryzae*. *Braz Arch Biol Technol*, 58 (2): 175-184.
35. Çerçi B, Koçyiğit A, Karaboz İ. 2011. Gıdaların işlenmesinde kullanılan enzimlerin rekombinant DNA teknolojisi ile üretimi. *Elektronik Mikrobiyol Derg TR* (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi), 09 (3): 1-7. [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110301.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110301.pdf)
36. Sousa M. J, Ardo Y, McSweeney P. L. H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J*, 11, 327-345.
37. Maoz A, Mayr R, Scherer S. 2003. Temporal stability and biodiversity of two complex antilisterial Cheese-Ripening. Microbial Consortia. *Appl Environ Microbiol*, 69 (7): 4012-4018.
38. Akuzawa R, Fox P.F. 2004. Acid phosphatase in cheese. *Animal Sci J*, 75, 385-391.
39. Hassan A.A, Mansour E.H, El Bedawey A.E.A, Zaki M.S. 2014. Improving dough rheology and cookie quality by protease enzyme. *American J Food Sci Nut Research*, 1(1): 1-7.
40. Li A.N, Li D.C. 2009. Cloning, expression and characterization of the serine protease gene from *Chaetomium thermophilum*. *J Appl Microbiol*, 106 (2): 369-80.
41. Mótýán J.A, Tóth F, Tózsér J. 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3 (4): 923-942.
42. Kanlayakrit W, Bovornreungroj P. 2005. Isolation and characterization of salt loving protease producing bacteria form fish Sauce Samples. *Kasetsart J Nat Sci*, 39, 88-97.
43. Udomsil N, Rodtong S, Tanasupawat S, Yongsawatdigul J. 2010. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds, *Int J Food Microbiol*, 141, 186-194.
44. Cho I.H, Choi E.S, Lim H.G, Lee H.H. 2004. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from Earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biology*, 37 (2): 199-205.
45. Ningthoujam D.S, Thokchom S. 2016. Screening of fibrinolytic enzymes from microorganisms especially *Actinomycetes* from different biotopes in manipur. *Arch Clin Microbiol*, 7, 3.
46. Peng Y, Huang Q, Zhang R, Zhang Y. 2003. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amynoliquefaciens* DC-4 screened from *douchi*, a traditional Chinese soybean food. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 134, 1, 45-52.
47. Sumi H, Nakajima N, Yatgai C. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack 'Shiokara' a Japanese traditional fermented food. *Comp Biochem Physiol*, 112 (3): 543-547.
48. Prihanto A.A, Darius, Firdaus M. 2013. Proteolytic and fibrinolytic activities of halophilus lactic acid bacteria from two Indonesian fermented foods, *J Microbiol Biotechnol Food Sci*, 2 (5): 2291-2293.
49. Borah D, Yadav R.N.S, Sangra A, Shahin L, Chaubey A.K. 2012. Production, purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis*, isolated from tea garden soil samples of Dibrugarh, Assam, *Asian J Pharm Clin Res*, 5 (3): 124-125.
50. Aradhya P.K, Chavan M.D. 2014. Production and characterization of fibrinolytic enzyme from *Aspergillus niger*, *World J Pharmacy and Pharmaceutical Sci*, 3 (9): 843-851.
51. Uylaşer V, Konak A. 2004. Gıdalardaki biyojen aminler ve insan sağlığı açısından önemi. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi*, 6, 26-33.
52. Alper N, Temiz A. 2001. Gıdalardaki biyojen aminler ve önemi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 58 (2): 71-80.
53. Collins J.D, Noerrung B, Budka H, Andreoletti O, Buncic S, Griffin J, Hald T, Havelaar A, Hope J, Klein G, Koutsoumanis K, McLauchlin J, Müller-Graf C, Nguyen-The C, Peixe L, Maradona M.P, Ricci A, Sofos J, Threlfall J, Vagsholm I, Vanopdenbosch E. 2011. Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA J*, 9 (10): 2393.
54. Kimura B, Konagaya Y, Fujii T. 2001. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce, *Int J Food Microbiol*, 70, 71-77.
55. Konagaya Y, Kimura B, Ishida M, Fujii T. 2002. Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium. *J Appl Microbiol*, 92, 1136-1142.

56. Kobayashi T, Kajiwara M, Wahyuni M, Kitakado T, Hamada-Sato N, Imada C, Watanabe E. 2003. Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria isolated from 'terasi' shrimp paste: A traditional fermented seafood product in Indonesia. *J Gen Appl Microbiol*, 49, 279-286.
57. Françoise L. 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Int J Syst Evol Microbiol*, 27 (6): 698-709, doi: 10.1016/j.fm.2010.05.016.
58. Tsai Y.H, Lin C.Y, Chang S.C, Chen H.C, Kung H.F, Wei C.I, Hwang D.F. 2005. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan, *Food Microbiol*, 22, 461-467.
59. Pushpa S, Murthy and Madhava M. 2010. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. *World Appl Sci J*, 8 (2), 199-205.
60. Soares I, Távora Z, Barcelos R.P, Baroni S. 2012. Microorganism produced enzymes in the food industry. *Scientific, Health and Social Aspects of The Food Industry*, Benjamin Valdez (ed), ISSN 978-953-307-916-5.
61. Vidhyasagar V, Saraniya A, Jeevaratnam K. 2013. Identification of pectin degrading lactic acid bacteria from fermented food sources. *In J Adv Lif Sci*, 6, 1.
62. Beg Q. K, Kapour M, Mahajan L, Hoondal G.S. 2001. Microbial xylanase and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 326-338.
63. Subramaniyan S, Prema P. 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol Lett*, 183 (1): 1-7.
64. Wejse P.L, Ingvorsen K, Mortensen K.K. 2003. Xylanase production by a novel halophilic bacterium increased 20-fold by response surface methodology. *Enzyme Microb Technol*, 32, 721-727.
65. WainQ M, Ingvorsen K. 2003. Production of  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the extremely halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis*. *Extremophiles*, 7, 87-93.

## COLOUR CHANGE AND WEIGHT LOSS DURING THE ROASTING PROCESS FOR PRODUCTION OF CAROB POWDER

Hilal Şahin-Nadeem<sup>1\*</sup>, Ayhan Topuz<sup>2</sup>, Aslı Arslan Kulcan<sup>2</sup>,  
Mehmet Torun<sup>2</sup>, Feramuz Özdemir<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Adnan Menderes University, Aydın, Turkey

<sup>2</sup>Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Akdeniz University, Antalya, Turkey

Received / Geliş tarihi: 22.06.2016

Received in revised form / Düzeltilek Geliş tarihi: 17.11.2016

Accepted / Kabul tarihi: 19.12.2016

### Abstract

The effect of different roasting times (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 and 90 min) and temperatures (135, 150 and 165 °C) on the weight loss and apparent colour change of carob powder was investigated. The roasting time and temperature significantly ( $P<0.05$ ) affected the colour parameters  $L$  and  $b$  and weight loss of the samples. However, the colour parameter  $a$  was only affected by the roasting time. The total colour difference increased by about 60 % when the temperature was increased from 135 to 165°C. Furthermore, the significant changes in weight loss (WL) and colour parameters were simulated using three-dimensional models. The changes in  $L$  were well described by the paraboloid model, whereas the Gaussian model was more suitable to describe the weight loss and total colour difference of the carob powder.

**Keywords:** *Ceratonia siliqua* L., carob powder, roasting, weight loss, colour

## KEÇİBOYNUZU TOZU ÜRETİMİNDE KAVURMA PROSESİ SÜRESİNCE RENK DEĞİŞİMİ VE AĞIRLIK KAYBI

### Öz

Farklı kavurma süreleri (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 ve 90 dakika) ve sıcaklıklarının (135, 150 ve 165°C) keçiboynuzu tozunun görünür renk değişimi ve ağırlık kaybı üzerine etkisi araştırılmıştır. Kavurma süresi ve sıcaklığı örneklerin renk parametrelerinden olan  $L$  ve  $b$  değerleri ile ağırlık kaybını önemli derecede ( $P<0.05$ ) etkilemiştir. Ancak, renk parametrelerinden  $a$  değeri sadece kavurma süresinden etkilenmiştir. Sıcaklığın 135'den 165°C'ye artması ile toplam renk değişiminde %60'lık bir artış görülmüştür. Ayrıca ağırlık kaybı ve renk parametrelerindeki önemli değişikliklerin üç boyutlu modellere uygunluğu test edilmiştir. Keçiboynuzu tozunun ağırlık kaybı ve toplam renk değişiminin tanımlanmasında Gaussian modeli en uygun model olarak belirlenirken, paraboloid model ise renk parametrelerinden  $L$  değerindeki değişim için en uygun model olarak belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Ceratonia siliqua* L., keçiboynuzu tozu, kavurma, ağırlık kaybı, renk

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ hilal.nadeem@adu.edu.tr,

☎ (+90) 213 7503 - 3558,

☎ (+90) 256 214 6687

## INTRODUCTION

Carob is a fruit of the perennial leguminous tree *Ceratonia siliqua* L., which is native to the Mediterranean basin and Southwest Asia (1). The dry fruit mass of carob consists of 90 % pod and 10% seeds (2, 3). The seeds are used to produce locust bean gum; mainly used in the food industry (4). The pod of carob is rich in sugars (40–60 %, mostly sucrose), D-pinitol, minerals, dietary fibre and polyphenols (1, 5-10). Pods are utilized as a processed carob syrup (pekmez in Turkish), carob powder for human consumption (1, 11, 12) as well as animal feed. The carob powder produced by roasting and milling of the carob kibbles is mainly used as a substitute or extender of cacao in baking and chocolate manufacturing (13-15). In Turkey, carob powder is also consumed as a hot drink like Turkish coffee.

During the production of carob powder, kibbled carob is subjected to high roasting temperatures for variable times depending on the type of roaster used and the desired characteristics of final product, i.e. lightly, medium or highly roasted carob powder. In conventional roasting, a temperature of 120–180 °C is used for 10 to 60 minutes (16). Moisture loss and important chemical reactions, including sugar caramelisation and/or the Maillard reaction takes place during the roasting. These changes significantly affect the overall product quality and palatability (14). The food industry can therefore control some important parameters i.e. physical (weight loss and density), chemical (Maillard reaction) and organoleptic (colour, texture, aroma and flavour) to obtain the desired quality of their products (17-22).

Monitoring physical properties of foods is relatively easy and rapid as compared to the chemical properties while roasting. The physical changes, mostly using a kinetic approach with regression analysis during the roasting of certain foods, such as coffee (17, 21, 23), cocoa (24) and nuts (25-29), have been studied by different researchers to optimise the process. Three-dimensional (3D) modelling has also been studied to understand the colour changes during roasting of hazelnuts (30), sesame seeds (18) and pistachio nuts (31).

Per the best of our literature knowledge, there are no reports that present the information regarding the effects of roasting conditions on physical

parameters, such as colour and weight loss of carob powder. The current study was aimed to investigate the effects of temperature and time of the roasting process on weight loss and colour parameters ( $L$ ,  $a$ ,  $b$  and total colour difference TCD) of the carob powder. Furthermore, the compatibility of different mathematical models for expressing the observed changes during roasting was also studied to predict colour changes and weight loss of carob powder.

## MATERIALS AND METHODS

### Roasting

The carob sample was obtained from a local producer in Antalya, Turkey. Kibbled carob samples (~8 x 10 mm size) were weighed in glass plates and placed in an oven (Model UM 500, Memmert, Schwabach, Germany, equipped with fan) at various temperatures i.e. 135, 150 and 165 °C and time intervals i.e. 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 and 90 minutes to roast them. After cooling to room temperature, the roasted samples were grinded in a mill (Model MKM 6000, Bosch, Leipzig, Germany) and filtered (60 mesh, VIBRO, Retsch, Haan, Germany) to obtain fine powders which were stored in polyethylene bags at 4°C for further analysis.

### Analyses

Moisture determination of the samples was carried out according to Nicoli et al. (2006) (32). Weight loss (g/100 g) was calculated from the weight of carob samples before ( $W_0$ ) and after roasting ( $W$ ) using equation 1:

$$WL = 100(W_0 - W)/W_0 \quad (1)$$

Colour analyses of the carob powder samples were carried out using a colour meter (model Chroma Meter CR-400, Konica-Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan). Colour parameters were expressed as  $L$  (darkness/whiteness),  $a$  (greenness/redness) and  $b$  (blueness/yellowness) on the Hunter scale. The total colour difference (TCD) was calculated using equation 2:

$$TCD = \sqrt{(L_0 - L)^2 + (a_0 - a)^2 + (b_0 - b)^2} \quad (2)$$

where  $L_0$ ,  $a_0$  and  $b_0$  are the colour values of the unroasted carob powder (32, 33). The instrument was standardised against a white tile ( $L = 97.02$ ,  $a = 0.08$ , and  $b = 1.75$ ) before each measurement. Each colour value was obtained as the mean of three measurements.

**Statistical analysis**

The experiment was set up as a randomised plot with a factorial design in the roasting temperature and the roasting time (3x10) in triplicate. The data were then subjected to variance analysis, and appropriate mean separation was conducted using Duncan’s multiple-range test in the SAS System for Windows V7 software (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA).

**Modelling of the weight loss and colour change**

The significant changes in the weight loss and colour parameters were plotted as a function of roasting time and temperature. The following plane, paraboloid, Gaussian and Lorentzian non-linear equations (Eq. 3–6) were employed for 3D modelling using the Sigma Plot (9.0) data processing program:

$$y = y_0 + aT + bt \tag{3}$$

$$y = y_0 + aT + bt + cT^2 + dt^2 \tag{4}$$

$$y = ae^{-\frac{1}{2}(((T-T_0)/b)^2 + ((t-t_0)/c)^2)} \tag{5}$$

$$y = \frac{a}{((1+((T - T_0) / b)^2)(1 + ((t - t_0) / c)^2))} \tag{6}$$

where  $y$  is the dependent variable (weight loss and colour parameters);  $y_0$ ,  $T_0$  and  $t_0$  are intercepts;  $a$ ,  $b$ ,  $c$  and  $d$  are regression parameters; and  $T$  and  $t$  are the independent variables of temperature (°C) and time (min).

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Weight loss and colour parameter changes of carob powder**

The average moisture content of unroasted kibbled carob powder samples was 8.03 g/100 g that reduced to 1.92, 1.37 and 0.90 g/100 g after 90 min of roasting at 135, 150 and 165°C, respectively. These moisture values were found to be lower than those reported by Yousif and Alghzawi (14) but similar with our previous data (16). Either a difference in the raw material characteristics and roasting conditions or different ambient conditions could cause differences in the moisture contents of the samples.

As expected, both loss of moisture and heat-induced reaction products, such as CO<sub>2</sub> and organic components (sugar and protein), during roasting (17, 18, 23) caused a decrease in the weight, and thus the *WL* value of the samples increased. Figure 1 shows the behaviour of weight loss of the samples at temperatures of 135, 150 and 165 °C. The changes in *WL* values during the roasting process at different temperatures and times were found to be significant ( $P < 0.01$ ; Table 1). Higher *WL* values of the carob powder were found at higher roasting temperatures and longer roasting times (Fig. 1). At tested roasting temperatures, the observed change in the *WL* values of the carob samples was almost linear at roasting times from 0 to 20 min followed by partly non-linear deceleration behaviour of samples roasted at 135°C and 150°C. The *WL* mean values of the carob powders at different roasting temperatures and times are given in Table 2 and Table 3, respectively. The *WL* values of the samples increased by 36.32 % when the roasting temperature was increased from 135 to 165°C while the *WL* mean value was found as 18.25 % after 90 min of roasting. The current findings related to the *WL* behaviour of carob powder were like few previous studies on coffee beans (17, 23) where a quasi-linear behaviour was followed by a noticeable deceleration.

Table 1. Variance analyses of roasting variables on quality parameters of the carob powder

Source of Variation	DF	WL		L		a		b		TCD	
		MS	F	MS	F	MS	F	MS	F	MS	F
RT	2	111.71	1050.55*	504.07	387.51*	0.84	2.41 <sup>NS</sup>	72.20	57.67*	572.82	262.67*
RP	9	384.98	3620.36*	502.50	386.30*	5.76	16.49*	108.88	86.97*	565.97	259.53*
RT x RP	18	14.22	133.72*	68.45	52.62*	1.16	3.33*	22.09	17.64*	82.05	37.63*
Error	60	0.11		1.30		0.35		1.25		2.18	

\*: significance at  $P < 0.01$  <sup>NS</sup>: not significant; RT: roasting temperature; RP: roasting period

Table 2. Effects of roasting temperatures on quality parameters of the carob powder

Roasting Temperature (°C)	WL (%)	L	a	b	TCD
135	6.52 <sup>c</sup> ± 0.87	56.86 <sup>a</sup> ± 0.66	11.01 ± 0.21	20.04 <sup>a</sup> ± 0.28	5.93 <sup>c</sup> ± 0.68
150	7.48 <sup>b</sup> ± 1.02	54.72 <sup>b</sup> ± 1.10	10.77 ± 0.17	18.32 <sup>b</sup> ± 0.57	8.34 <sup>b</sup> ± 1.17
165	10.24 <sup>a</sup> ± 1.58	48.94 <sup>c</sup> ± 2.25	11.09 ± 0.19	16.95 <sup>c</sup> ± 1.13	14.41 <sup>a</sup> ± 2.42

Values are mean ± standard error, N=30

Values in a column followed by different superscript letters are significantly ( $P < 0.05$ ) different (Duncan's multiple-range test)

Table 3. Effects of roasting time on quality parameters of the carob powder

Roasting Periods (min)	WL (%)	L	a	b	TCD
0	0.00 <sup>j</sup> ± 0.00	62.08 <sup>a</sup> ± 0.30	8.88 <sup>d</sup> ± 0.07	20.78 <sup>a</sup> ± 0.10	0.00 <sup>b</sup> ± 0.00
5	1.56 <sup>i</sup> ± 0.10	60.04 <sup>b</sup> ± 0.37	10.96 <sup>bc</sup> ± 0.34	21.16 <sup>a</sup> ± 0.41	3.38 <sup>a</sup> ± 0.36
10	2.76 <sup>h</sup> ± 0.15	59.02 <sup>bc</sup> ± 0.28	10.59 <sup>c</sup> ± 0.23	20.95 <sup>a</sup> ± 0.48	3.82 <sup>a</sup> ± 0.32
15	4.05 <sup>g</sup> ± 0.17	58.07 <sup>cd</sup> ± 0.34	10.91 <sup>bc</sup> ± 0.28	20.86 <sup>a</sup> ± 0.49	4.79 <sup>a</sup> ± 0.32
20	5.25 <sup>f</sup> ± 0.18	57.15 <sup>d</sup> ± 0.30	11.32 <sup>ab</sup> ± 0.14	20.90 <sup>a</sup> ± 0.39	5.66 <sup>a</sup> ± 0.33
30	7.11 <sup>e</sup> ± 0.35	55.95 <sup>e</sup> ± 0.34	11.24 <sup>ab</sup> ± 0.25	20.33 <sup>a</sup> ± 0.55	6.81 <sup>a</sup> ± 0.55
45	11.11 <sup>d</sup> ± 0.69	51.88 <sup>f</sup> ± 1.67	11.68 <sup>a</sup> ± 0.28	18.28 <sup>b</sup> ± 0.76	11.02 <sup>a</sup> ± 1.79
60	13.66 <sup>c</sup> ± 0.97	47.22 <sup>g</sup> ± 2.77	11.64 <sup>a</sup> ± 0.16	15.82 <sup>c</sup> ± 1.22	16.01 <sup>c</sup> ± 3.00
75	17.02 <sup>b</sup> ± 1.50	42.60 <sup>h</sup> ± 3.27	11.18 <sup>abc</sup> ± 0.28	12.92 <sup>d</sup> ± 1.58	21.25 <sup>c</sup> ± 3.55
90	18.25 <sup>a</sup> ± 1.69	41.07 <sup>i</sup> ± 3.22	11.17 <sup>abc</sup> ± 0.31	12.37 <sup>d</sup> ± 1.70	22.89 <sup>a</sup> ± 3.56

Values are mean ± standard error, N=9

Values in a column followed by different superscript letters are significantly ( $P < 0.05$ ) different (Duncan's multiple-range test)

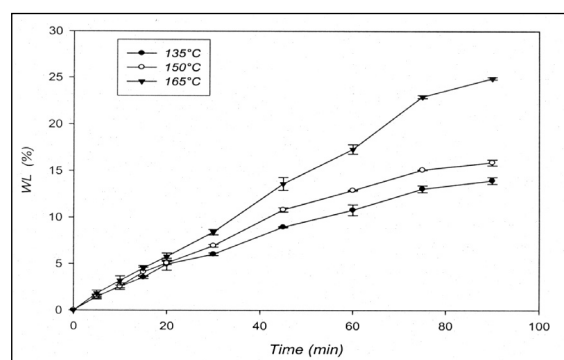


Fig. 1 Changes in the weight loss (WL) value of the carob powder obtained by the roasting processes at different times and temperatures

Figures 2–4 illustrate the colour changes in the carob powder during the roasting process at 135, 150 and 165°C. The roasting temperature did not cause a noticeable effect on the colour parameter values of the samples during the initial roasting period while a different behaviour was observed in the subsequent roasting period. The higher the roasting temperature caused a greater change in colour. The colour parameters *L* and *b* were significantly ( $P < 0.01$ ) decreased by the roasting process. When the temperature was increased from 135 to 165°C, the *L* and *b* values decreased by 13.93 % and 15.42 %, respectively. A similar behaviour in these colour parameters was also

reported by Kahyaoglu (31) while roasting pistachio nuts. However, an increment in the *L* values was reported in hazelnut (28), sesame (18), coffee (32) and peanut (34) during the initial period of the roasting process. Kahyaoglu and Kaya (18) reported that low moisture content, denaturation of protein and a high concentration of oil particles embedded in the protein matrix could cause an increase in the *L* value during the initial period of roasting. Considering these explanations, the decrease in the *L* values in the present study can be related to the low oil content of the carob pod (12) rather than a low moisture content or denaturation of protein.

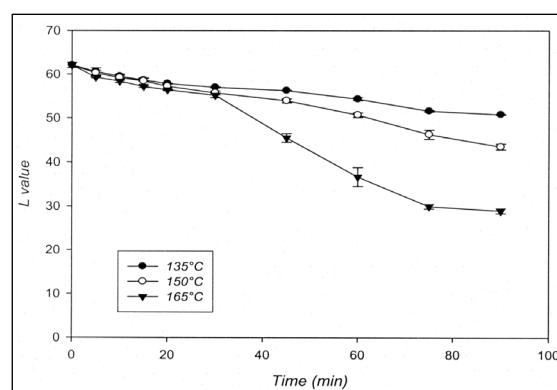


Fig. 2 Changes in the L value of carob powder obtained by the roasting processes at different times and temperatures

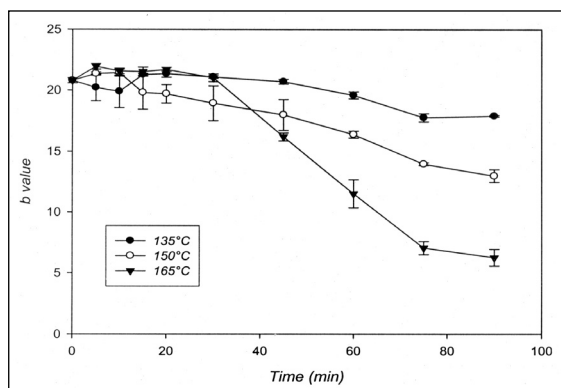


Fig. 3 Changes in the b value of carob powder obtained by the roasting processes at different times and temperatures

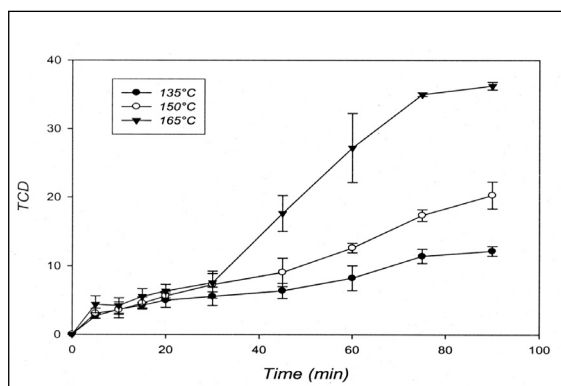


Fig. 4 Changes in the total color difference (TCD) value of carob powder obtained by the roasting processes at different times and temperatures

The colour *a* value did not significantly change by an increase in roasting temperature but roasting time was positively correlated with the colour *a* value (Tables 2 and 3). In fact, the colour *a* value of the samples increased by around 20 % during the 90 min of roasting time. The *TCD* of the samples significantly increased at higher temperatures and longer roasting time (Table 2). There was 60%

increase when the temperature was increased from 135 to 165°C. That increase in the *TCD* was almost fivefold between 30 and 75 min roasting time at 165°C, which implies that the chemical reactions that result in the colour change of the carob powder particularly accelerate in this time interval. The light red-brownish colour of the unroasted carob changes to dark brown after roasting due to Maillard reactions and caramelization of the compounds in carob powder (16).

### Modelling of the weight loss and colour parameters during roasting

In the present study, non-linear regression analysis was employed by using 3D equations (Eq. 3–6) to model the weight loss and changes in colour parameters as a function of the roasting temperature and time. The details of the 3D non-linear equations employed (plane, paraboloid, Gaussian and Lorentzian) were reported by Şimşek (30).

The coefficient of determinations ( $R^2$ ) and standard error of estimations (*SEE*) of the tested non-linear equations are given in Table 4. The  $R^2$  values, which describe the predictive models for the dependent variables were 70–98 %. The maximum  $R^2$  and minimum *SEE* values were used for the degree of fitting of the experimental data to the prescribed models. The changes in the *WL* values of carob powder were plotted in the Gaussian model (Eq. 5;  $R^2 = 0.976$ ). The partial regression parameters were predicted by fitting the experimental data of the *WL* parameters in the Gaussian model (Table 5). The predicted *WL* function of the carob powder is plotted in Figure 5. It is clear from the plot that the *WL* parameters are behaving in a sigmoidal way for roasting time and in a curvilinear way for temperature.

Table 4. The values of regression coefficient ( $R^2$ ) and standard error of estimation (*SEE*) for 3D models.

Quality characteristic		Plane	Paraboloid	Gaussian	Lorentzian
<i>WL</i>	$R^2$	0.922	0.933	0.976*	0.944
	<i>SEE</i>	1.947	1.876	1.133	1.720
<i>L</i>	$R^2$	0.801	0.811*	0.771	0.772
	<i>SEE</i>	4.076	4.128	4.542	4.539
<i>b</i>	$R^2$	0.695	0.717*	0.679	0.684
	<i>SEE</i>	2.393	2.395	2.554	0.532
<i>TCD</i>	$R^2$	0.789	0.799	0.973*	0.966
	<i>SEE</i>	4.480	4.552	1.678	1.874

\* The coefficient ( $R^2$ ) was preferred for mathematical modeling of the quality parameters.

Table 5. Mathematical models of the quality parameters of the roasted carob powder

Quality Characteristics	3D	PRC	E	SE	P	
WL	Gaussian	$T_0$	1087.4	19492	0.9560	( $R^2= 0.976$ )
		$t_0$	87.4	3.836	<0.0001	( $SEE=1.133$ )
		$a$	88490.0	15647152	0.9955	
		$b$	227.1	2364	0.9243	
		$c$	40.1	2.5	<0.0001	
L	Paraboloid	$y_0$	-78.98	159.09	0.624	( $R^2= 0.811$ )
		$a$	2.16	2.13	0.322	( $SEE=4.128$ )
		$b$	-0.222	0.10	0.033	
		$c$	-0.01	0.01	0.267	
		$d$	-0.002	0.001	0.865	
b	Paraboloid	$y_0$	53.87	92.29	0.565	( $R^2= 0.717$ )
		$a$	-0.33	1.24	0.791	( $SEE=2.395$ )
		$b$	-0.03	0.06	0.588	
		$c$	0.0008	0.0041	0.855	
		$d$	-0.0009	0.0006	0.177	
TCD	Gaussian	$T_0$	825.8	7118.7	0.9086	( $R^2= 0.973$ )
		$t_0$	93.5	5.5	<0.0001	( $SEE=1.678$ )
		$a$	6816706	907261779	0.9941	
		$b$	134.1	709.5	0.8516	
		$c$	40.5	3.2	<0.0001	

PRC, Partial regression coefficient; E, Estimated value of PRC

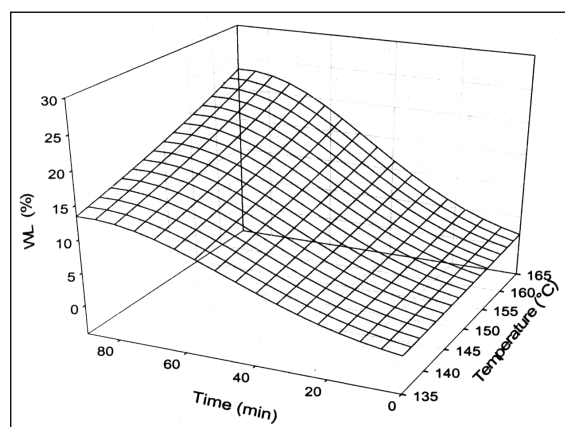


Fig. 5 3-D plot of the weight loss (WL) of the carob powder

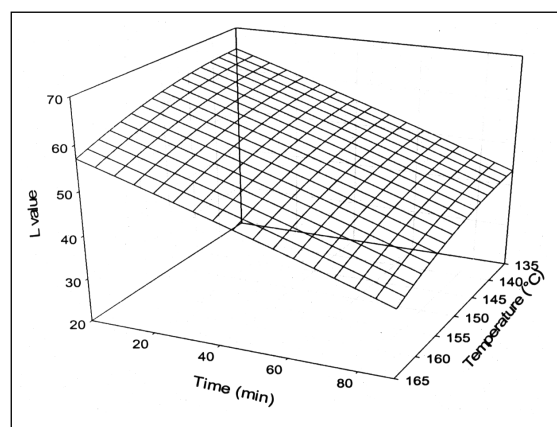


Fig. 6 3-D plot of the L value of the carob powder

The changes in  $L$  and  $b$  values were obtained from the paraboloid model (Eq. 3) by using the highest  $R^2$  and the lowest  $SEE$  values (Table 4). The paraboloid model that describes the changes in the  $L$  values and the predicted  $L$  function of the carob powder is shown in Figure 6. Although the highest value of  $R^2$  was used, the paraboloid model (Fig. 7) still did not significantly correspond to the changes in the  $b$  value (Table 5). Şimşek (30) reported that the changes in the  $L$  and  $b$  values of hazelnuts during the roasting process agreed with the paraboloid model.

The experimental data of  $TCD$  did fit ( $R^2 = 0.973$ ) in the Gaussian model. The predicted values of the partial regression coefficient of the Gaussian model and the surface function of the  $TCD$  values are shown in Table 5 and Figure 8, respectively. Considering the fitting quality of the current experimental data to the Gaussian model, the  $TCD$ , which comprises all colour coordinates, can be used for roasting of carob in terms of colour quality.



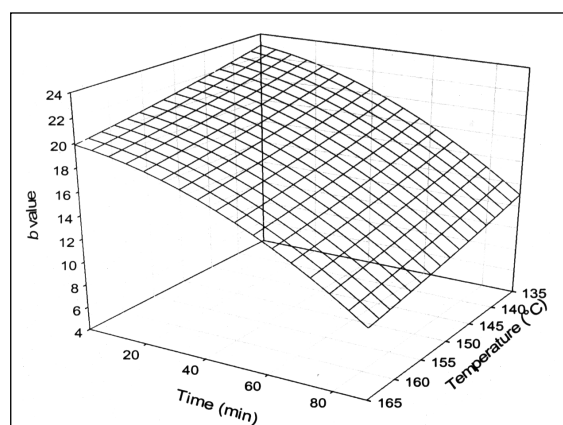


Fig. 7 3-D plot of the *b* value of the carob powder

## CONCLUSION

This work presents the weight loss and the change in colour parameters (*L*, *a*, *b* and *TCD*) of carob powder during different roasting conditions. The results showed that roasting temperature affected the weight loss and all the colour parameters except colour *a* value. The roasting time was a key factor in determining the overall quality of the product due to its significant ( $P < 0.01$ ) effects on all controlled parameters. It was also observed that the heat-induced reactions, which lead to significant changes in the weight loss and colour parameters of the carob powders, accelerates during 30–75 min of roasting time at all tested temperatures. Therefore, the optimum roasting degree can be standardized between 30 and 75 min of roasting time. The 3D non-linear equations were also used successfully to predict the potential changes during roasting. The changes in the *L* values of the carob powder were well described by the paraboloid model while the Gaussian model was found to be the best for describing the changes in the WL and *TCD* values of the carob powder.

## Acknowledgment

We thank to Dr. Said Nadeem for proofreading.

## REFERENCES

1. Santos M, Rodrigues A, Teixeira JA. 2005. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochem Eng J*, 25(1): 1-6.

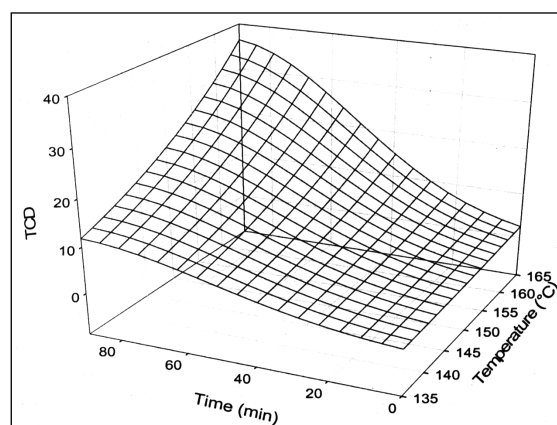


Fig. 8 3-D plot of the *TCD* value of the carob powder

2. Karkacier M, Artik N. 1995. Determination of physical properties, chemical composition and extraction condition of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *Food*, 20(3): 131-136.
3. Karababa E, Coşkun Y. 2013. Physical properties of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): An industrial gum yielding crop. *Ind Crops Prod*, 42: 440-446.
4. Gonçalves S, Romano A. 2005. Locust bean gum (LBG) as a gelling agent for plant tissue culture media. *Sci Horti (Amst)*, 106(1): 129-134.
5. Owen R, Haubner R, Hull W, Erben G, Spiegelhalder B, Bartsch H, Haber B. 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food Chem Toxicol*, 41(12): 1727-1738.
6. Petit MD, Pinilla JM. 1995. Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *Lebensm-Wiss Technol*, 28(1): 145-152.
7. Tetik N, Turhan I, Oziyci HR, Karhan M. 2011. Determination of d-pinitol in carob syrup. *Int J Food Sci Nutr*, 62(6): 572-576.
8. Tetik N, Yuksel E. 2014. Ultrasound-assisted extraction of D-pinitol from carob pods using Response Surface Methodology. *Ultrason Sonochem*, 21(2): 860-865.
9. Roseiro LB, Duarte LC, Oliveira DL, Roque R, Bernardo-Gil MG, Martins AI, Sepúlveda C, Almeida J, Meireles M, G rio FM, Rauter AP. 2013. Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Ind Crops Prod*, 47: 132-138.

10. Roseiro LB, Tavares CS, Roseiro JC, Rauter AP. 2013. Antioxidants from aqueous decoction of carob pods biomass (*Ceratonia siliqua* L.): Optimisation using response surface methodology and phenolic profile by capillary electrophoresis. *Ind Crops Prod*, 44: 119-126.
11. Turhan I, Tetik N, Aksu M, Karhan M, Certel M. 2006. Liquid–solid extraction of soluble solids and total phenolic compounds of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.). *J Food Process Eng*, 29(5): 498-507.
12. Özcan M, Arslan D, Gökçalık H. 2007. Some compositional properties and mineral contents of carob (*Ceratonia siliqua*) fruit, flour and syrup. *Int J Food Sci Nutr*, 58(8): 652-658.
13. Race D, Curtis A, Booth W. 1999. Carob agroforestry industry: an assessment of its potential for the low–medium rainfall Murray Valley region. *Aust J Exp Agric Anim Husb*, 39(3) 325-334
14. Yousif AK, Alghzawi H. 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*, 69(3): 283-287.
15. Vitali Cepo D, Mornar A, Nigovic B, Kremer D, Radanovic D, Vedrina Dragojevic I. 2014. Optimization of roasting conditions as an useful approach for increasing antioxidant activity of carob powder. *Lebensm-Wiss Technol*, 58(2): 578-586.
16. Şahin H, Topuz A, Pischetsrieder M, Özdemir F. 2009. Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *Eur Food Res Technol*, 230(1): 155-161.
17. Hernandez J, Heyd B, Irls C, Valdovinos B, Trystram G. 2007. Analysis of the heat and mass transfer during coffee batch roasting. *J Food Eng*, 78(4): 1141-1148.
18. Kahyaoglu T, Kaya S. 2006. Modeling of moisture, color and texture changes in sesame seeds during the conventional roasting. *J Food Eng*, 75(2): 167-177.
19. Künsch U, Schärer H, Patrian B, Höhn E, Conedera M, Sassella A, Jermini M, Jelmini G. 2001. Effects of roasting on chemical composition and quality of different chestnut (*Castanea sativa* Mill) varieties. *J Sci Food Agric*, 81(11): 1106-1112.
20. Lukac H, Amrein TM, Perren R, Conde-Petit B, Amadò R, Escher F. 2007. Influence of roasting conditions on the acrylamide content and the color of roasted almonds. *J Food Sci*, 72(1): C033-C038.
21. Mendes LC, de Menezes HC, Aparecida M, Da Silva A. 2001. Optimization of the roasting of robusta coffee (*C. canephora* conillon) using acceptability tests and RSM. *Food Qual Prefer*, 12(2): 153-162.
22. Alessandrini L, Romani S, Pinnavaia G, Dalla Rosa M. 2008. Near infrared spectroscopy: An analytical tool to predict coffee roasting degree. *Anal Chim Acta*, 625(1): 95-102.
23. Dutra E, Oliveira L, Franca A, Ferraz V, Afonso R. 2001. A preliminary study on the feasibility of using the composition of coffee roasting exhaust gas for the determination of the degree of roast. *J Food Eng*, 47(3): 241-246.
24. Krysiak W. 2006. Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *J Food Eng*, 77(3): 449-453.
25. Demir AD, Celayeta JMF, Cronin K, Abodayeh K. 2002. Modelling of the kinetics of colour change in hazelnuts during air roasting. *J Food Eng*, 55(4): 283-292.
26. Fallico B, Arena E, Zappala M. 2003. Roasting of hazelnuts. Role of oil in colour development and hydroxymethylfurfural formation. *Food Chem*, 81(4): 569-573.
27. Özdemir M, Devres O. 2000. Kinetics of color changes of hazelnuts during roasting. *J Food Eng*, 44(1): 31-38.
28. Özdemir M, Devres O. 2000. Analysis of color development during roasting of hazelnuts using response surface methodology. *J Food Eng*, 45(1): 17-24.
29. Wall MM, Gentry TS. 2007. Carbohydrate composition and color development during drying and roasting of macadamia nuts (*Macadamia integrifolia*). *Lebensm-Wiss Technol*, 40(4): 587-593.
30. Şimşek A. 2007. The use of 3D-nonlinear regression analysis in mathematics modeling of colour change in roasted hazelnuts. *J Food Eng*, 78(4): 1361-1370.

31. Kahyaoglu T. 2008. Optimization of the pistachio nut roasting process using response surface methodology and gene expression programming. *Lebensm-Wiss Technol*, 41(1): 26-33.
32. Nicoli M, Anese M, Manzocco L, Lericci C. 1997. Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree. *Lebensm-Wiss Technol*, 30(3): 292-297.
33. Jaya S, Das H. 2005. Accelerated storage, shelf life and color of mango powder. *J Food Process Pres*, 29(1): 45-62.
34. Moss J, Otten L. 1989. A relationship between colour development and moisture content during roasting of peanuts. *Can J Food Sc Tech J*, 22(1): 34-39.

## TARIMDA KULLANILAN ATRAZİNİN GİDERİMİNDE *RHIZOPUS ARRHZUS* KULLANIM POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ

Ülküye Dudu Gül<sup>1\*</sup>, Hülya Silah<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri MYO, Gülümbe, Bilecik, Türkiye

<sup>2</sup> Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Gülümbe, Bilecik, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 20.12.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 02.01.2017

Kabul tarihi / Accepted: 05.01.2017

### Öz

Tarımsal üretiminde kullanılan Atrazinin toprakta oluşan kalıntıları daha sonra yeraltı ve yerüstü sularına taşınmaktadır. Yüksek miktarlarda biriken Atrazin canlı organizmalar için toksik etki oluşturmaktadır. Atrazinle kirlenmiş sulu çevrelerin arıtımı önemli bir konu olmaktadır. Biyobirikim ve biyosorpsiyon bu tür kirleticilerin çevreden gideriminde çevre dostu bir yöntem olarak önerilmektedir. Bu çalışmanın amacı hem besiyerinde gelişmekte olan hem de kurutulmuş fungal biyokütlenin Atrazin giderim kapasitesini belirlemektir. Çalışmada *Rhizopus arrhizus* kültürünün biyobirikim ve biyosorpsiyonla Atrazin giderimine pH değerlerinin etkisi belirlenmiştir. Atrazin analizinde elektrokimyasal yöntem kullanılmıştır. Biyobirikim ve biyosorpsiyon sonunda en iyi Atrazin giderimi sırasıyla pH 4 ve pH 6'da gerçekleşmiştir. Gelişmekte olan *R. arrhizus* kültürü ve kurutulmuş fungal biyokütle sırasıyla %57.45 ve %63.16 Atrazin giderimi gerçekleştirmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre fungal biyokütle pestisitlerle kirlenmiş sıvı ortamlardan Atrazin giderimini kısa bir zaman aralığında gerçekleştirebilmiştir. Denemeler tarımsal üretiminde yaygın olarak kullanılan Atrazinin çevreye olumsuz etkilerini azaltmak için alternatif olarak fungal biyokütlenin kullanılabilirliğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Atrazin, fungus, tarım

## DETERMINATION THE POTENTIAL USAGE OF *RHIZOPUS ARRHZUS* FOR REMOVAL OF ATRAZINE USED IN AGRICULTURE

### Abstract

Atrazine is commonly used in agricultural activities. Atrazine residues occur in soil and then move to underground and surface waters. The higher amount of Atrazine is toxic for living organisms. The treatment of Atrazine contaminated aqueous environment is an important issue. Bioaccumulation and biosorption is suggested as an eco-friendly way to remove this kind of pollutants in the environment. The aim of this study is to determine the Atrazine removal capacity of both growing *Rhizopus arrhizus* culture and dried fungal biomass. The effect of different pH values on Atrazine bioaccumulation and biosorption by *R. arrhizus* culture was determined in this study. Electrochemical methods were used for Atrazine analyse. The optimal pH for Atrazine removal was determined as 4 and 6 for bioaccumulation and biosorption, respectively. The growing *R. arrhizus* culture and dried *R. arrhizus* biomass removed 57.45% and 63.16% of Atrazine, respectively. According to the results of this study the fungal strain was effectively removed Atrazine from pesticide contaminated aqueous solutions in a short time period. This study showed that the fungal systems can be used as alternative ways to reduce negative environmental impact of Atrazine.

**Keywords:** Atrazine, Fungus, agriculture

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ulkuyedudu.gul@bilecik.edu.tr,

☎ (+90) 228 214 1374,

☎ (+90) 228 214 1017

## GİRİŞ

Dünyadaki tüm ülkeler için en önemli besin kaynağını tarım ürünleri oluşturmaktadır. Gün geçtikçe artan nüfusun beslenme ihtiyacının karşılanması amacıyla ürün verimini arttırmak için iyi tarım uygulamaları gündeme gelmiştir. Bu uygulamalar kapsamında ürüne zarar verecek ve verimliliği etkileyecek nitelikteki her tür zararlı ot, bitki ve böceklerin, ürüne zarar vermesinin önüne geçilmek için zirai mücadele çalışmaları yapılmaktadır. Modern tarımsal uygulamalar sentetik pestisitlerin yaygın olarak kullanımına ve gelişimine yol açmıştır (1). Ülkemizde genel olarak az pestisit tüketilmesine karşın, en yoğun tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır (2). Dünya genelinde 80'den fazla ülkede gıda üretiminde Atrazin kullanılmaktadır (3). Atrazin yaygın olarak mısır, şeker pancarı ve diğer bitkilerin üretiminde yaprak ve ot oluşumunun seçici kontrolü amacıyla kullanılmaktadır (4). Atrazin suda çözünürlüğü yüksektir (33 mg/L) ve toprağa adsorpsiyon yeteneği düşüktür (5). Bu nedenle Atrazin yüzey, yer altı suları ve içme sularına kolaylıkla karışmaktadır (6). Atrazin sağlığa olumsuz etkilerinin yanısıra akuatik ekosistemler için de zararlıdır. Sağlığa olumsuz etkilerinden biri endokrin sistemi engelleyici rol oynamasıdır. Örneğin yapılan bir çalışmada Atrazin erkek farelerde testosteron üretimini engelleyici rolü gösterilmiştir (7). Ayrıca Atrazin dendrit hücre yüzeyindeki MHC-I leri uzaklaştırmak suretiyle immün hasara neden olmaktadır (8).

Tarımsal uygulamalarda kullanılan pestisitlerin yüzey ve yer üstü sularında yüksek konsantrasyonlarda birikmesi ise önemli sağlık ve çevre sorunlarına neden olmaktadır. Bu nedenle bu pestisitlerin sucul ortamlardan uzaklaştırılması çok önemlidir. Biyolojik arıtım pestisitler gibi organik maddelerin mineralizasyonunda ucuz ve kolay uygulanabilen bir metod olduğu için tercih edilmektedir (9). Son dönemde pestisitlerin biyolojik arıtımına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (10-12).

Bu çalışmada zirai mücadele uygulamalarında sıklıkla kullanılan ve kullanım sonucunda toprak ve su kirlenmesine neden olan Atrazin biyolojik metodlarla sulu ortamlarda gideriminde *Rhizopus arrhizus* fungusunun kullanım olasılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla *R. arrhizus* türünün hem gelişmekte olan kültürleri hem de

ölü biyosorbentleri ile yaygın kullanılan Atrazin sulu ortamlardan giderimi araştırılmıştır.

Günümüzde yaygın kullanılan pestisitlerin sulama ve içme sularında, gıda numunelerindeki miktar tayinleri ancak doğru ve güvenilir analitik yöntem ve tekniklerin kullanımıyla mümkündür. Pestisit tayininde HPLC ve GC gibi yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır (13) ancak literatürde elektrokimyasal analiz yöntemleri ile ilgili pek az bilgi bulunmaktadır.

Çalışmada tarımsal üretimde yaygın olarak kullanılan ve sucul ortamlarda yüksek konsantrasyonlarda biriktiğinde ciddi sağlık problemlerine yol açan, akuatik ekosistemlere zarar veren Atrazin sızı ortamlardan filamentli mantar türü kullanılarak giderilmesi araştırılmıştır. Denemelerde elektrokimyasal analiz yöntemleri kullanılarak Atrazin tayini yapılmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Mikroorganizma Kültürü

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *R. arrhizus* saf kültürleri kullanılmıştır. Saf kültürler patates dekstroz agar bulunan tüplere ekilmiş olup buzdolabında +4 °C'de saklanmak suretiyle muhafaza edilmektedir.

### Besiyeri

Bu çalışmada maliyeti düşürmek ve çevre kirliliğine neden olan diğer bir atık maddenin değerlendirilmesi amacıyla Eskişehir şeker fabrikası atığı olan melas kullanılmıştır. Melaslı Besiyeri içeriği: 1.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Melas Çözeltilisi (yaklaşık 10 g/L sükröza denk miktarda) (14).

### Pestisit Solüsyonu Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan stok Atrazin solüsyonu 1000 mg/mL'lik stok çözeltisi %25 metanol-%75 saf su içeren ortamda hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti 4°C'de buzdolabında saklandı. Bu stok solüsyondan istenilen miktarlar gelişmekte olan mikroorganizmalarla yapılan deneyler için melaslı besiyerine eklendi. Biyosorpsiyon çalışmalarında ise distile su bulunan ortama eklendi. Çalışmada kullanılan pestisit ile ilgili detaylı bilgi Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan Atrazinin özellikleri  
Table 1. The properties of Atrazine used in this study

Pestisit Adı	IUPAC ismi	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı (g/mol)
Atrazin/Atrazine	1-Chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> CIN <sub>5</sub>	215.68

### Pestisit Giderim Deneyleri

Çalışmalarda mikrobiyel giderimde rol alan iki mekanizma denenmiştir. İlk olarak besiyerinde gelişmekte olan canlı mikroorganizmaların biyogiderim yeteneklerine bakılmıştır. Daha sonra ölü kurutulmuş mikroorganizmalarla biyosorpsiyon deneyleri yapılmıştır.

### Besiyerinde Gelişmekte Olan *R. arrhizus* Kültür Koşulları

Çalışmalarda 250 ml'lik erlenlerde 100 ml melaslı besiyerinde gelişmekte olan mikroorganizma kültür ortamının pH'ı ayarlandıktan sonra istenilen miktarda Atrazin eklendi. Besiyerine inokule edilen *R. arrhizus* kültürü inkübatörde (Nüve EN 120) inkübasyona bırakıldı. Çalışmada mikroorganizma bulunmayan, aynı miktarda pestisit içeren besiyerleri kontrol amacıyla kullanılmıştır.

### Biyosorpsiyon Çalışmaları için Biyokütle Hazırlanması

Çalışmada tüplerde 5 ml melaslı besiyerinde (pH: 5) 2 günde 30 °C'de inkübatörde (Nüve EN 120) geliştirilen *R. arrhizus* biyokütlesinin tamamı steril koşullarda pH'sı 5'e ayarlanmış 250 ml'lik erlen içerisindeki 100 ml melaslı besiyerine transfer edildi. 10 gün boyunca 30 °C'de inkübatörde geliştirildi. Biyokütle inkübasyon süresi sonunda besiyerinden hasatlanıp, %1'lik formaldehitte muamele edildikten sonra 80 °C'de 24 saatte etüvde bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler mikserde öğütüldükten sonra elekten geçirilerek kullanılmıştır. Elde edilen biyokütle pestisit ve ditile su içeren 250 ml'lik erlenlere 1 g/L olacak şekilde eklenerek pestisit giderim deneyleri yapılmıştır.

### Pestisit Gideriminde Optimal Koşulların Belirlenmesi

Mikroorganizmaların pestisit giderim kapasitesi günlük alınan pestisit içeren besiyeri ortamındaki pestisit miktarları Atrazin için elektrokimyasal olarak belirlendi. Mikrobiyel pestisit giderimine

optimal pH ve pestisit konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Besiyerinde gelişmekte olan mikroorganizmaların pestisit giderimine pH etkisinin belirlenmesi için 250 ml'lik erlenlerde 100 ml sıvı besiyeri hazırlanarak pH'sı 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 olarak ayarlanmıştır. Biyosorpsiyon deneylerinde ise 200 ml saf suda farklı 2, 4, 6, 8 ve 10 gibi farklı pH değerleri denenmiştir. Bu değerler arasında en uygun pH belirlenmiştir. Biyosorpsiyon deneylerinde ayrıca 5, 10, 15, 30 ve 50 mg/L pestisit konsantrasyonlarının etkisi araştırılmıştır.

### Atrazin Tayin Yöntemi

Atrazin miktarının analizleri için CompactStat Potentiostat ve C3\_Cell\_Stand (Potansiyotat)/IVIUM- BASI isimli cihaz kullanılmıştır. Sulu ortamlardan alınan numunelerin analiz edilmesi sonucu elde edilen voltagramlardaki pik akımlarındaki azalış takip edilerek yüzde giderim hesaplamaları yapılmıştır. Atrazin analizi için yöntem geliştirmek amacıyla sıvı numunelerdeki Atrazin elektrokimyasal tayininde pH taraması için Britton Robinson tamponu (BRT) hazırlandı. BRT için 2.7 mL fosforik asit, 2.3 mL asetik asit ve 2.5 gram borik asit 1 L saf suda çözülerek stok tampon çözelti hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltiden 100 mL alınarak üzerine damla damla 0.1 M HCl eklenerek pH 2 ve yine 100 er mL alınıp üzerine damla damla 0.1 M NaOH eklenerek pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11 hazırlandı. Stok Atrazin çözeltisi 2000 mg/L Atrazin içerecek şekilde metanolde çözülerek hazırlandı. pH taraması için öncelikle hücreye 10 mL pH 2 BRT tamponu eklendi ve kare dalga yöntemi ile voltamogramı kaydedildi. Daha sonra standart atrazin eklemeleri yapıldı. Farklı pH ortamlarında 39.2, 76.92 ve 113.2 mg/L Atrazin standart çözeltileri için elde edilen voltamogramlar Şekil 1'de verilmiştir. Şekil 1'de hem 1 hem de 2 numaralı grafikte pH 2 BRT tamponunda Atrazine aittir ikinci grafikte sadece eksen değiştirilerek piklerin daha net görünmesi sağlanmıştır. Bu grafiklerde a) 10 mL pH 2 BRT b) 39.2 c) 76.92 d) 113.2 mg/L Atrazin içermektedir. Atrazin olduğu bölgede a ile belirtilen yerde herhangi bir

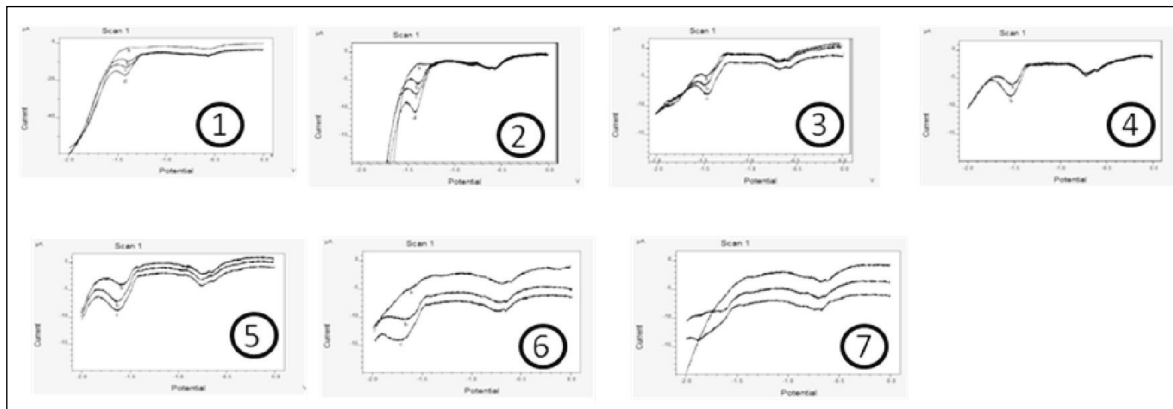
pik bulunmamaktadır. Dolayısı ile b, c ve d grafiklerinde görülen ve standart Atrazin eklemesi ile yükseklikleri artan piklerin atrazine ait olduğu gösterilmiştir. Yapılan analizler sonunda pH 6'dan sonraki pH larda pikler bozulmaya başlamıştır. Bu nedenle en son pH 7 de ölçüm alınarak pH taraması tamamlanmıştır. Yapılan bu deneyler sonucunda pH 2 BRT tamponunun Atrazin analizi için uygun olduğu belirlenmiştir.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

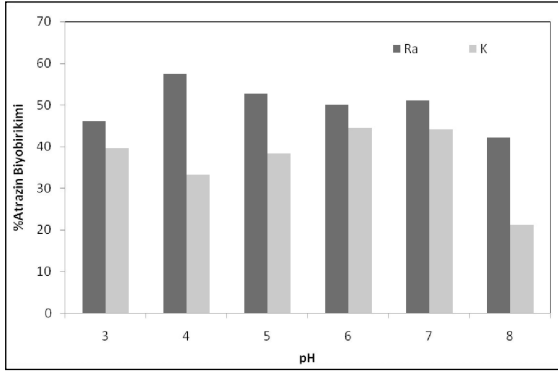
Bu çalışmada elektrokimyasal yöntemler ile Atrazin karbon elektrotlar kullanılarak incelendi ve kantitatif tayinde elektrokimyasal yöntem ve koşullar belirlenmiştir. İlk olarak çalışmada kullanılan Atrazin aktif maddesinin voltametrik tayinleri için en uygun parametreler belirlenmiştir. Bunun için atrazinin öncelikle dönüşümlü voltametri ile indirgenme veya yükseltgenme davranışları ve elektrot reaksiyonun karakteri (adsorpsiyon veya difüzyon kontrollü olup olmadığı) incelenmiştir. Daha sonra atrazinin elektrokimyasal davranışları ve bazı parametrelerin (pH, karıştırma hızı, biriktirme süresi, biriktirme potansiyeli gibi) optimizasyonu yapılarak uygun bir analitik yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem mikroorganizma giderim ortamından elde edilen numuneleri ile ticari formülasyondaki aktif madde miktarının tayininde kullanılarak yöntemin geçerliliği gösterilmiştir.

## Atrazin Biyobirikimine pH Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmalarda *R. arrhizus* fungusunun en iyi Atrazin giderimi yaptığı besiyeri pH'sını belirlemek için farklı pH değerlerindeki melaslı besiyerlerine Atrazin eklenerek analiz edilmiştir. Bu amaçla 250 ml'lik erlenlerde pH'sı 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 olan 5 mg/L Atrazin içeren 100 ml melaslı besiyerleri hazırlandı ve *R. arrhizus* inoküle edildi. İnkübasyon süresi boyunca günlük 3 ml örnekler alındı ve 10000 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernetantlar elektrokimyasal olarak analiz edilmiştir. pH etkisi deneyi sonucu Şekil 2'de verilmiş olup, tüm pH değerlerinde kontrol gruplarındaki Atrazin miktarı da azalmıştır. Yapılan bir çalışmada Atrazinin hem alkali hem de asidik pH değerlerinde kimyasal olarak hidroliz olduğu rapor edilmiştir (15). Benzer bir durumda beyaz çürükçül mantar türü ile Atrazin biyodegradasyonu çalışan araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Bu çalışmada kültür ortamında bir taraftan Atrazin biyodegradasyonu gerçekleşirken, diğer taraftan kimyasal degradasyonun olduğu gösterilmiştir (16). Aynı çalışmada 5 günlük inkübasyon sonunda Atrazinin %59'nun giderildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ise 3 günlük inkübasyon sonunda *R. arrhizus* % 57.45 giderim yapmıştır. Buna ilaveten zamanla Atrazinin mantar bulunmayan ortamda da bozunmaya uğradığı saptanmıştır. Bu durum literatürdeki Atrazinin hem asidik hem de bazik sulu ortamlarda zamana bağlı olarak kimyasal olarak hidrolizlendiğini belirten rapor ile örtüşmektedir (15).



Şekil 1. Farklı pH ortamlarında farklı konsantrasyonlarda Atrazin standart çözeltileri için elde edilen voltamogramlar (1: pH 2 BRT tamponunda; 2: pH 2 BRT tamponunda; 3: pH 3 BRT tamponunda; 4: pH 4 BRT tamponunda; 5: pH 5 BRT tamponunda; 6: pH 6 BRT tamponunda; 7: pH 7 BRT tamponunda a) 39.2 mg/L Atrazin b) 76.92 mg/L Atrazin c) 113.2 mg/L Atrazin)  
Figure 1. The voltagrams of Atrazine standart solutions in different pH values (1: pH 2 BRT buffer; 2: pH 2 BRT buffer; 3: pH 3 BRT buffer; 4: pH 4 BRT buffer; 5: pH 5 BRT buffer; 6: pH 6 BRT buffer; 7: pH 7 BRT buffer a) 39.2 mg/L Atrazine b) 76.92 mg/L Atrazine c) 113.2 mg/L Atrazine



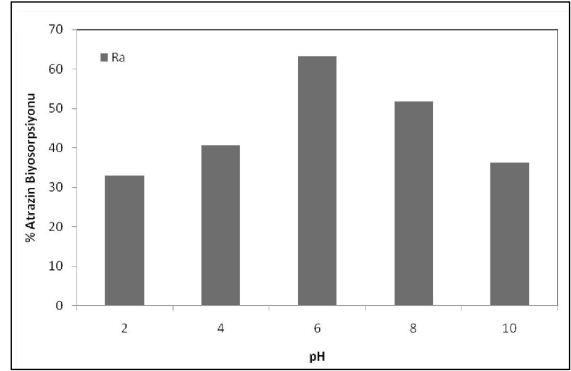
Şekil 2. Gelişmekte olan mantar kültürü ile Atrazin giderimine farklı pH değerlerinin etkisi (Ra: *Rhizopus arrhizus*; Kontrol: Mikroorganizma içermeyen grup; 5 mg/L Atrazin; 3. gün)  
Figure 2. The effect of pH on removal of Atrazine by growing fungal culture (Ra: *Rhizopus arrhizus*; Control: without microorganism; 5 mg/L Atrazine; 3. day)

### Biyosorpsiyon Çalışmaları

Biyosorpsiyon deneylerinde her iki mikroorganizmanında ölü biyokütelleri deney ortamında 1 g/L olacak şekilde kullanılmıştır. Deneyler 250 ml'lik erlenlerde 200 ml distile su ortamında gerçekleştirilmiştir. Belirli saat aralıklarıyla 3 ml numuneler alınarak pestisit miktarındaki değişim takip edilmiştir.

### pH'in Biyosorpsiyona Etkisi

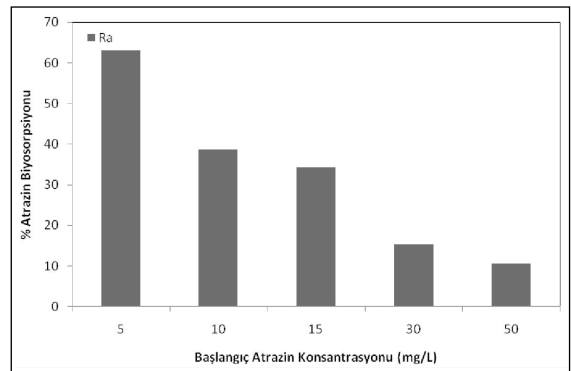
Çalışmada kullanılan mantar türünün biyosorpsiyonla Atrazin giderimine pH'ın etkisinin belirlenmesi için farklı pH değerlerine (pH: 2, 4, 6, 8, 10) ayarlanmış ortamlarda başlangıç konsantrasyonu 5 mg/L olan Atrazin'in giderimi incelenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda Atrazin'in farklı pH değerlerinde 480 dakika sonunda kayda değer bir kimyasal bozunma geçirmediği tespit edilmiştir. *R. arrhizus* türü 480 dakika sonunda pH 6'da en iyi Atrazin giderimini gerçekleştirmiştir (Şekil 3). Pathak ve Dikshit (2012) mantar kolonilerini kurutarak elde ettikleri biyosorbentleri kullanmış ve en iyi Atrazin gideriminin pH 6'da gerçekleştiğini göstermiştir (17). Yapılan başka bir çalışmada ise Amberlisit kullanılarak Atrazin adsorpsiyonu incelenmiş ve en iyi pH 6.5 bulunmuştur (18). Çalışma bulguları literatürde verilen bilgilerle uyumlu olup, Atrazin biyosorpsiyonu için optimal pH 6 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Atrazin Biyosorpsiyonuna pH etkisi (Ra: *Rhizopus arrhizus*, Başlangıç Atrazin Konsantrasyonu: 5 mg/L, Temas Süresi: 480 dak.)  
Figure 3. The effect of pH on Atrazine biosorption (Ra: *Rhizopus arrhizus*, Initial Atrazine Concentration: 5 mg/L, Contact Time: 480 minutes)

### Başlangıç Atrazin Konsantrasyonunun Biyosorpsiyona Etkisi

Bu çalışmada başlangıç Atrazin konsantrasyonunun biyosorpsiyona etkisinin belirlenmesi için 5, 10, 15, 30 ve 50 mg/L Atrazin konsantrasyonları denemiştir. Artan Atrazin konsantrasyonu biyosorpsiyonu olumsuz etkilemiştir (Şekil 4). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada yeni izole edilen mikroorganizma biyokütelleri ile Atrazin (5 mg/L) biyosorpsiyonunun 24 saat sonunda maksimum % 55.3 olduğu gösterilmiştir (19). Bu çalışmada ise *R. arrhizus* türünden kurutulmuş elde edilmiş biyosorbent 5 mg/L Atrazin'in %63.16'sını gidermiştir.



Şekil 4. Atrazin Biyosorpsiyonuna başlangıç Atrazin Konsantrasyonu etkisi  
Figure 4. The effect of initial Atrazine concentration on biosorption



Bu çalışmada tarımsal gıda üretim faaliyetlerin artması sonucu önemli bir çevre sorunu haline gelen pestisitlerin filamentli mantar türü tarafından giderim kapasitesi belirlenmiştir. Çalışmada hem gelişmekte olan hem de kurutulmuş mantar biyokütleleri kullanılmıştır. Özellikle son yıllarda önem kazanan mikroorganizmalar yolu ile atıkların temizlenmesi ve değerlendirilmesi teknolojisi olan biyoremediasyon ile gelişmekte olan filamentli mantar kütlelerinin Atrazin gibi pestisitler tarafından kirlenmiş sulak alanlarda kullanım olanakları araştırılmıştır. Gelişmekte olan *R. arrhizus* türünün Atrazin giderim kapasitesinin belirlenmesi için yapılan deneyler sonucunda melaslı besiyerinde gelişmekte olan *R. arrhizus* türünün Atrazin biyogiderimi %57.45 olarak gerçekleştirmiştir. *R. arrhizus* türünden elde edilen biyokütle ile yapılan biyosorpsiyon deneylerinde ise giderim %63.16 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre *R. arrhizus* türünün hem biyobirikim hem de biyosorpsiyon mekanizmaları ile pestisit giderimini gerçekleştirebildiği görülmüştür. İki mekanizma karşılaştırıldığında *R. arrhizus* türünün biyosorpsiyon performansının daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma *R. arrhizus* türü kullanılmak suretiyle Atrazin pestisitinin verimli bir şekilde biyolojik olarak arıtımın gerçekleştirilebileceğini göstermiş olup, yeni bir biyolojik arıtım modeli oluşturulması için ön deneme niteliği taşımaktadır. Bu suretle oluşturulacak modelin ticari anlamda biyolojik arıtım sistemlerinde kullanımı verimli arıtımın oluşması nedeniyle enerji ve zaman tasarrufunun yanısıra biyolojik arıtım verimini de artırıcı bir etki göstereceği için ticari anlamda önem kazanmaktadır.

### Teşekkür

Bu çalışmaya 113Y590 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

1. Thomas KV, Hurst MR, Matthiessen P, Sheahan D, Williams RJ. 2001. Toxicity Characterisation of Organic Contaminants in Stormwaters from an Agricultural Headwater Stream in South East England. *Water Research*, 35: 2411-2416.

2. Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C, Burçak A. 2005. Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı Ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongresi, 6-7 Ocak, Ankara, Türkiye, 629-648.

3. Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart A, Vonk A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant dose. *PANS*, 99 (8): 5476-5480.

4. Topp E, Mulbry W, Zhu H, Nour S, Cuppels D. 2000. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by *Nocardioideis sp.* Isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (8): 3134-3144.

5. Ying G, Kookana RS, Mallavarpu M. 2005. Release behavior of triazine residues in stabilized contaminated soils. *Environ Pol*, 134: 71-77.

6. Ghosh PK, Philip L. 2006. Environmental significance of atrazine in aqueous systems and its removal by biological processes an overview. *Global NEST J*, 8 (2): 159-178.

7. Friedmann SA. 2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Rep Toxicol*, 16: 275-279.

8. Pinchuk ML, Lee RS, Filipov MN. 2007. In vitro atrazine exposure affects the phenotypic and functional maturation of dendritic cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 223 (3): 206-217.

9. Eker S, Kargı F. 2006. Kinetic modeling and parameter estimation in biological treatment of 2,4-dichlorophenol containing wastewater using rotating perforated tubes biofilm reactor. *Enzyme Microb Technol*, 38: 860-866.

10. Shawaqfeh AT. 2010. Removal of Pesticides from Water Using Anaerobic-Aerobic Biological Treatment. *Chinese J Chem Eng*, 18 (4): 672-680.

11. Moriera FC, Vilar VJP, Ferreira ACC, Dos Santos FRA., Dezotti M, Sousa MA, Goncalves C, Boaventura RAR, Alpendurada MF. 2012. Treatment of a pesticide-containing wastewater using combined biological and solar-driven AOPs at pilot scale, *Chem Eng J*, 209: 429-441.

12. Vilar VJP, Moreira FC, Ferreira ACC, Sousa MA, Gonçalves C, Ipendurada MF. 2012. Biodegradability enhancement of a pesticide-containing bio-treated wastewater using a solar photo-Fenton treatment step followed by a biological oxidation process, *Water Res*, 46 (15): 4599–613.
13. Min G, Wang S, Zhu H, Fang G, Zhang Y. 2008. Multi-walled Carbon Nanotubes as Solid-phase Extraction Adsorbents for determination of Atrazine and Its Principal Metabolites in Water and Soil Samples by Gas Chromatography- Mass Spectrometry. *Sci Total Environ*, 396: 79-85.
14. Dönmez G. 2002. Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. *Enzyme Microbial Technol*, 30: 363-366.
15. Armstrong DE, Chesters G, Harris RF. 1967. Atrazine hydrolysis in soil. *Soil Sci Soc Am Proc*, 31: 61 - 66.
16. Aracagök YD, Kolankaya N. 2012. Biodegradation of atrazine by a selected white-rot fungal strain in optimized conditions. *European Int J Sci Technol*, 1 (2): 1- 10.
17. Pathak RK, Dikshit AK. 2012. Effect of Various Environmental Parameters on Biosorptive Removal of Atrazine from Water Environment. *Int J Environ Sci Development*, 3 (3): 289- 293.
18. Kyriakopoulos G, Xiarchos I, Doulia D. Removal of pesticides from aqueous solutions by adsorption, 3rd European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment. October, 7-10, Greece. 2004.
19. Pathak RK, Dikshit AK. 2011. Isolation and Characterization of Bacterial Strains to be Used as Biosorbent for Removal of Atrazine from Wastewater. 2nd International Conference on Environmental Science and Technology (IPCBEE), 26- 28 February, Singapore, 137- 140 p.

## **MERCANKÖŞK (*OREGANUM HERACLEOTICUM L.*) VE BAHÇE KEKİĞİ (*THYMUS VULGARIS L.*) UÇUCU YAĞI İÇEREN SOYA BAZLI YENİLEBİLİR FİMLERİN PATOJEN BAKTERİLERE KARŞI ANTİMİKROBİYEL ETKİLERİ**

**Gökçe Polat Yemiş<sup>1,\*</sup>, Zehra Karagöz Emiroğlu<sup>2</sup>, Kezban Candoğan<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya

<sup>2</sup>Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü, Ankara

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

Geliş / Received: 08.12.2016; Kabul / Accepted: 07.01.2017; Online baskı / Published online: 08.02.2017

Polat Yemiş, G., Karagöz Emiroğlu Z., Candoğan, K. (2017). Mercanköşk (*Oreganum heracleoticum L.*) ve bahçe kekiği (*Thymus vulgaris L.*) uçucu yağı içeren soya bazlı yenilebilir filmlerin patojen bakterilere karşı antimikrobiyel etkileri *GIDA* (2017) 42 (3): 268-276 doi: 10.15237/gida.GD16106

### **Öz**

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (%1, 2, 3, 4 ve 5) mercanköşk (*Oreganum heracleoticum L.*) ve bahçe kekiği (*Thymus vulgaris L.*) uçucu yağı ilave edilerek hazırlanmış izole soya proteini bazlı yenilebilir filmlerin *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis ve *Bacillus cereus* üzerine antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir. Mercanköşk ve bahçe kekiği uçucu yağı içeren filmlerin minimum konsantrasyonda (%1 w/v) tüm test bakterilerine karşı etkin antibakteriyel aktivite gösterdiği, kekik uçucu yağı içermeyen kontrol filmlerinin ise hiçbir şekilde inhibisyon zonu oluşturmadığı saptanmıştır. *S. Enteritidis* % 1 konsantrasyonda uçucu yağ içeren yenilebilir filmlere karşı en duyarlı bakteri olarak belirlenirken, bunu *L. monocytogenes* ve *B. cereus* izlemiştir. Yapılan bu çalışma ile mercanköşk ve bahçe kekiği uçucu yağlarının soya proteini bazlı yenilebilir filmlerle birlikte kullanımının gıdalarda patojen kontrolü açısından gelecek vadeden bir uygulama olduğu ortaya konmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Yenilebilir film, antimikrobiyel aktivite, bahçe kekiği uçucu yağı, mercanköşk uçucu yağı

## **ANTIMICROBIAL EFFECTS OF SOY PROTEIN BASED EDIBLE FILM CONTAINING OREGANO (*OREGANUM HERACLEOTICUM L.*) AND THYME (*THYMUS VULGARIS L.*) ESSENTIAL OILS AGAINST FOODBORNE PATHOGENS**

### **Abstract**

In this present study, antibacterial effects of soy protein edible coatings incorporated with different concentrations (1, 2, 3, 4 or 5%) of essential oils from oregano (*Oreganum heracleoticum L.*) or thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oils (EOs) were determined against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Bacillus cereus*. Oregano and thyme essential oils showed inhibition against all test organisms even at minimum concentration (1.0%) applied into the film formulation. Soy protein coating solution without addition of essential oil had no inhibitory effect against none of the pathogenic bacteria tested. Data from antibacterial activity test reveal that soy protein films without addition of essential oil had no inhibitory effect against none of the pathogenic bacteria tested. Greater antimicrobial activity of soy edible films containing essential oils was demonstrated against *S. Enteritidis* followed by *L. monocytogenes* and *B. cereus*. The results of this study indicated that the oregano or thyme incorporated soy protein edible films could be a promising application for control of pathogens in food.

**Keywords:** Edible film, antimicrobial activity, thyme essential oil, oregano essential oil

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gokceyemis@sakarya.edu.tr,

☎ (+90) 264 295 7038,

☎ (+90) 264 295 5601

## GİRİŞ

Son yıllarda tüketicinin besin değeri yüksek, lezzetli, doğal ve güvenli gıdalara olan talebi nedeniyle, gıda bilimi ve teknolojisi alanında yapılan araştırmaların büyük bir bölümü yeni koruma teknolojilerine odaklanmıştır. Bu teknolojiler ise az işlem görmüş ve özellikle yapay katkı maddelerinden arındırılmış gıda üretimini amaçlamaktadır. Aktif ambalajlama gibi yeni ambalaj sistemleri bu teknolojiler içinde araştırmaların yoğunlaştığı uygulamalardan biri olarak dikkat çekmektedir. Aktif ambalajlama gıdayı sadece dış etkilere karşı korumakla kalmayıp, ambalaj materyaline ilave edilen aktif ajanlarla raf ömrünün uzamasını da sağlamaktadır. Aktif ambalajlamanın birçok formu mevcut olup bunlardan antimikrobiyel film ve kaplamaların kullanımı, gıdalarda ve özellikle taze et ürünleri ile süt ürünlerinde uygulama alanı bulan bir gıda koruma tekniğidir (1, 2).

Antimikrobiyel ambalaj materyalleri genellikle sentetik plastik bazlı iken son yıllarda çevre bilincinin de gelişmesiyle biyobozunur ve yenilebilir film ve kaplamaların bu amaçla kullanımı yaygınlaşmıştır. Yenilebilir filmler, basit üretim teknolojisi gerektirmeleri, ekonomik olmaları, doğal bileşiklerden elde edilmeleri, fonksiyonel özelliklerindeki çeşitlilik ve biyolojik olarak bozunabilmeleri nedeniyle son zamanlarda dikkat çeken ambalaj materyalleridir (3). Son yıllarda yapılan araştırmalarda, yağlar (katı yağlar, balmumları, sıvı yağlar), polisakkaritler (nişasta, alginat, selüloz eteri, kitozan, karragenan, pektin) ya da proteinlerden (kazein, peyniraltı suyu proteini, jelatin, fibrinojen, soya proteini, buğday gluteni, mısır proteini, yumurta albumini) oluşan yenilebilir film ve kaplamaların gıdalarda teknolojik kaliteyi iyileştirmesinin yanı sıra gıdaların tazelik ve güvenliğini artırdığı görülmüştür. Bunlar içerisinde gıda teknolojisinde yaygın olarak kullanılan polisakkarit ve protein bazlı film ve kaplamalardır (4). Yenilebilir film ve kaplama üretiminde kullanılan proteinler, mısır proteini, peyniraltı suyu proteini ve soya proteinleridir. Protein bazlı filmlere olan ilgiyle beraber, düşük oksijen geçirgenliğine sahip olmaları, LDPE-düşük yoğunluklu polietilen, HDPE-yüksek yoğunluklu polietilen, PS-polistren gibi birçok plastik bazlı filmlere göre daha iyi bariyerleme özelliği göstermeleri ve mekanik dirençleri nedeniyle

soya proteinleri, yenilebilir film üretiminde hammadde olarak kullanımı önerilen proteinlerden biri olmuştur (5).

Yenilebilir film ve kaplamalar nem kaybı, oksidasyon ve mikrobiyel bozulmalara karşı etkili olmaları ve nem, gaz ve diğer uçucu maddelerin difüzyonuna karşı bariyerleme özelliklerinin yanında tatlandırıcılar, antimikrobiyel maddeler, antioksidanlar, vitaminler ve renklendiricileri de içeren birçok katkı maddesi için taşıyıcı olarak görev yaparlar (6). Yenilebilir film formülasyonuna yüksek antioksidan özellikleriyle bilinen bazı doğal pigment maddelerinin yanı sıra, yüksek antimikrobiyel özellikteki uçucu yağlar, organik asitler ve bakteriyosinler de ilave edilebilmektedir (7). Antimikrobiyel yenilebilir film üretimi üzerine yapılan çalışmalar, doğrudan filme dahil edilebilen biyolojik türevli antimikrobiyel materyallerin daha etkin olacağı görüşü üzerinde odaklanmıştır. Yüksek fenolik içerikleri nedeniyle güçlü antimikrobiyel aktiviteye sahip olan uçucu yağların film formülasyonlarına ilavesinin filmlerin antimikrobiyel etkisini önemli oranda arttırdığı yapılan birçok çalışmada ortaya konmuştur (8-10). Seydim ve Sarıkuş (11), mercanköşk, biberiye ve sarımsak uçucu yağları ilave edilmiş peyniraltı suyu proteini bazlı yenilebilir filmlerin in-vitro koşullarda antimikrobiyel aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmada, film içinde kekik ve sarımsak uçucu yağlarının biberiye uçucu yağına kıyasla *S. aureus*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *E. coli* ve *L. plantarum*'a karşı etkin inhibisyon zonu verdiğini bildirmişlerdir. Ousallah ve ark. (12), taze et dilimi yüzeyine inoküle edilen *Pseudomonas* spp. ve *E. coli* O157:H7 bakterilerinin gelişimini değerlendirmek amacıyla %1 oranında mercanköşk uçucu yağı içeren süt proteini bazlı yenilebilir filmin antibakteriyel aktivitesi üzerinde çalışmışlardır. Sonuçta uçucu yağ içeren filmin, uçucu yağ içermeyen film ile muamele edilen et dilimi ve kontrol grubu ile kıyaslandığında mikroorganizma sayısını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. Kitozan içeren filmlere kekik, fesleğen ve anason uçucu yağlarının ilavesinin bologna salamalarında antimikrobiyel etkinliğinin incelendiği bir araştırmada, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'e karşı en etkili uygulamanın kekik yağı içeren kitozan filmi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca kekik uçucu yağının kitozan filmine ilavesinin film materyalinin özelliklerini de olumlu

etkilediği bildirilmiştir (13). Uçucu yağlar içinde kekik yağlarının mikroorganizmalar üzerinde etkili oldukları birçok araştırmada bildirilmiştir (14-17). Kekik türleri arasında geniş flavonoid ve fenolik asit içeriğine sahip iki önemli çeşit *Thymus vulgaris* (bahçe kekigi) ve *Oreganum heracleoticum* (mercanköşk)'dur. Güçlü antimikrobiyel ve antioksidan özelliğindeki timol ve karvakrol bahçe kekigi ve mercanköşk çeşitlerinin bileşiminin büyük bir kısmını oluştururlar (15, 16).

Bu çalışmada, iki farklı çeşit kekik yağı mercanköşk (*Oregano- Oreganum heracleoticum* L.) ve bahçe kekigi (*Thyme- Thymus vulgaris* L.) ilave edilerek hazırlanmış soya proteini bazlı yenilebilir filmlerin *L. monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis ve *B. cereus* üzerine antimikrobiyel etkileri belirlenmiştir.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Materyal

Araştırmada yenilebilir film materyali üretiminde kullanılan izole soya proteini (>%90 protein içeriği), Gürhak Gıda ve Kimyevi Maddeler San. Dış Tic. Ltd. Şti. (İstanbul)'nden, mercanköşk-oregano (*Oreganum heracleoticum* L.) ve bahçe kekigi-thyme (*Thymus vulgaris* L.) uçucu yağları ise Timtaş Tarım İlaç ve Mahsulleri Ticaret A.Ş.(Mersin)'den temin edilmiştir.

### Bakteri kültürü

Araştırmada, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) ve *B. cereus* bakteri kültürleri kullanılmıştır. Bakteri kültürleri % 15 gliserol içeren Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerinde -20 °C'da dondurularak muhafaza edilmiştir.

### Yenilebilir film üretimi

Soya proteini bazlı yenilebilir film çözeltisi hazırlanmasında, Choi ve ark. (18) ve Zivanovic ve ark. (19) tarafından önerilen yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla, %5 (w/v) oranında izole soya proteini destile su içerisine manyetik karıştırıcıda karıştırılarak yavaş yavaş eklenmiştir. Karışıma plastikleştirici olarak %3.5 oranında gliserol katılmıştır. Manyetik karıştırıcıda

5 dakika süre ile homojen hale getirilen karışımın pH sı 0.1 N NaOH ile pH 10'a ayarlanmıştır. Daha sonra 90 °C' deki su banyosunda 30 dakika bekletilmiş ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. 40 °C'ye soğutulan karışıma % 0.5 oranındaki Tween 20 ile süspanse edilmiş % 1, 2, 3, 4 ve 5 (w/v) oranında mercanköşk (O) ya da bahçe kekigi (T) uçucu yağı ilave edilerek homojenizatör (İka Ultra-Turrax T25) ile 13500 rpm'de 1 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Kekik yağı içeren (O veya T) ve kekik yağı içermeyen (SP) izole soya protein bazlı film çözelti grupları, hava kabarcıklarını elemine etmek amacıyla 4 kat peynir bezi ile vakum pompası kullanılarak süzölmüş ve elde edilen film çözeltilerinden steril plastik Petri kaplarına 15±0.1 g tartılarak 30°C' deki kurutma dolabında 72 saat kurutulmuştur.

### Yenilebilir film disklerinin kalınlık ve ağırlık değerlerinin belirlenmesi

Film kalınlıkları dijital mikrometre (Mitutoyo, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler rastgele 15 farklı bölgeden alınarak gerçekleştirilmiştir. Antibakteriyel aktivite testi için hazırlanan film diskleri 17 mm çapında kesilerek tartılmıştır. Farklı konsantrasyonda O ve T uçucu yağı içeren ve uçucu yağ içermeyen film disklerinin (SP) kalınlık ve ağırlık ortalama değerleri sırasıyla 0.310±0.082; 0.321±0.062; 0.200±0.007 mm ve 0.095±0.021; 0.094±0.018; 0.056±0.001 g olarak belirlenmiştir.

### Antibakteriyel aktivite testi

Yenilebilir filmlerin antibakteriyel aktivitesi Pranoto ve ark. (20) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Test bakterileri, Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerinde 37°C'da 24 saat inkübe edilerek aktive edilmiş ve steril swab ile Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) besiyeri yüzeyine yayılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (%1, 2, 3, 4, 5) O ve T uçucu yağlarını içeren 17 mm çapındaki filmler besiyerine yerleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. O ve T uçucu yağlarını içermeyen izole soya proteini bazlı filmler ise kontrol olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrasında disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapı milimetre olarak ölçülmüştür. Denemeler iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

### İstatistiksel değerlendirme

Araştırma sonucunda elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi SAS istatistik paket programı kullanılarak varyans analiz tekniği (ANOVA) ile yapılmış ve farklılık görülen gruplarda farklılığın hangi düzeyde olduğu LSD (Asgari Önemli Fark) testi uygulanarak ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir.

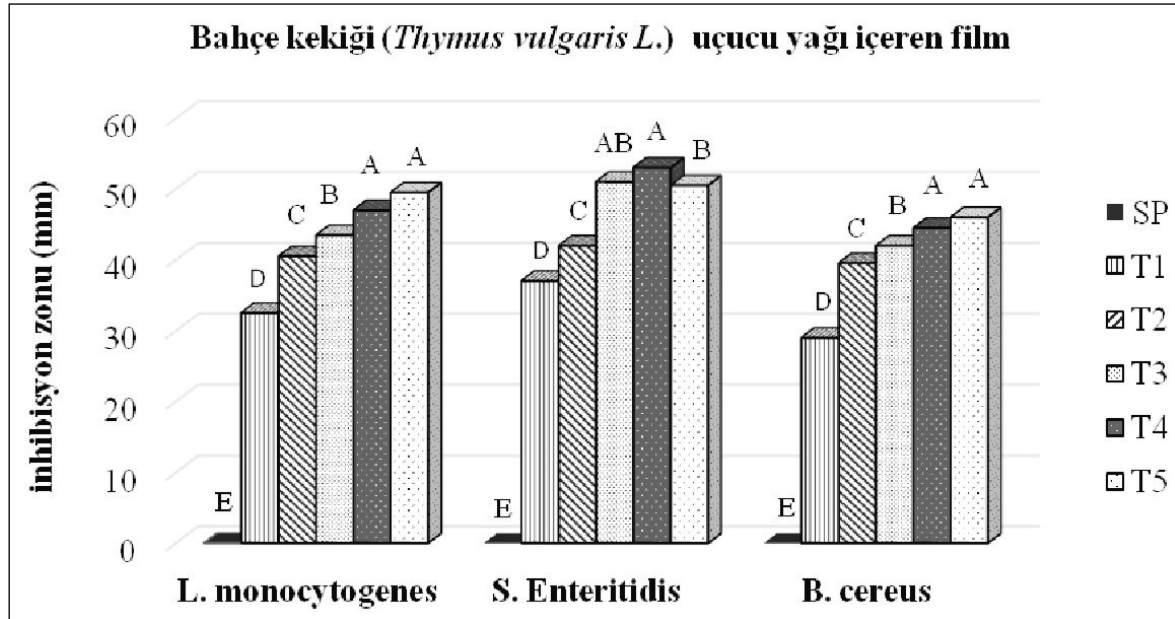
### SONUÇ ve TARTIŞMA

Farklı konsantrasyonlarda O ve T uçucu yağ ile hazırlanan (%0, 1, 2, 3, 4 ve 5) yenilebilir film diskleri ile kekik yağı içermeyen soya proteini bazlı yenilebilir film disklerinin *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* ve *B. cereus*'a karşı gösterdiği inhibisyon zonu çapları Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterilmiştir.

Yapılan agar difüzyon testinde, O ve T uçucu yağ içeren filmlerin minimum konsantrasyonda (%1 w/v) tüm test bakterilerine karşı etkin antibakteriyel aktivite gösterdiği, kekik uçucu yağ içermeyen kontrol filmlerinin ise hiçbir şekilde inhibisyon zonu vermediği belirlenmiştir (Şekil 1 ve Şekil 2). Genellikle, uçucu yağ konsantrasyonu arttıkça filmlerin inhibisyon etkisi de artış göstermiştir ( $P<0.05$ ). Araştırma bulgularına

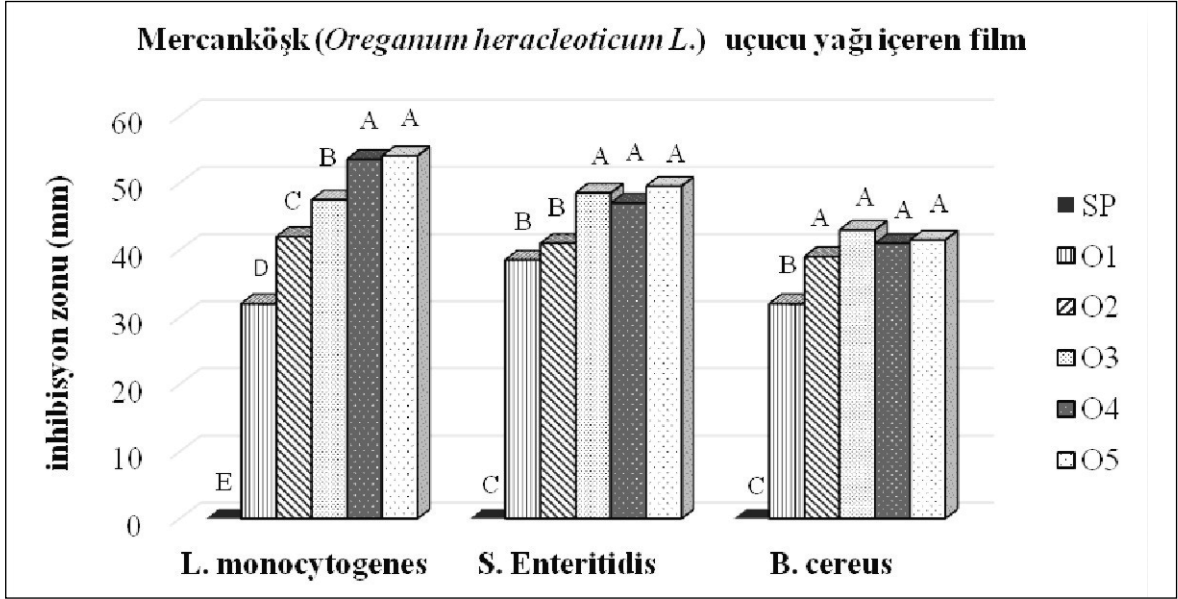
paralel olarak, Royo ve ark. (21), %1 oranında O uçucu yağ içeren peyniraltı suyu proteini bazlı yenilebilir filmlerin *L. innocua*, *S. Enteritidis* ve *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu bildirirken, Seydim ve Sarıküş (11) minimum %2 düzeyde O içeren peyniraltı suyu proteini bazlı yenilebilir filmlerin *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Yapılan araştırmalarda O uçucu yağın ait antibakteriyel etkinlik düzeyleri arasındaki bu farklılıkların, uçucu yağ kompozisyonu, uçucu yağdaki aktif bileşiklerin difüzyon hızı ve suş farklılıklarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Çeşitli uçucu yağların etkisinin farklı gıda patojenlerine karşı incelendiği bir çalışmada, etkin antibakteriyel aktivite düzeyi, etken maddenin hedef bakteriye karşı en yüksek inhibisyonun görüldüğü sınır konsantrasyon olarak bildirilmiştir (22). *L. monocytogenes* ile yapılan antimikrobiyal aktivite testinde, O uçucu yağ içeren film disklerinin verdiği zon çapları konsantrasyon arttıkça artmış ve konsantrasyonlar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Bakteri için O uçucu yağ ile yapılan denemede etkin antimikrobiyal aktivite düzeyinin %4 olduğu ve %4 ile %5 konsantrasyonda inhibisyon zonu

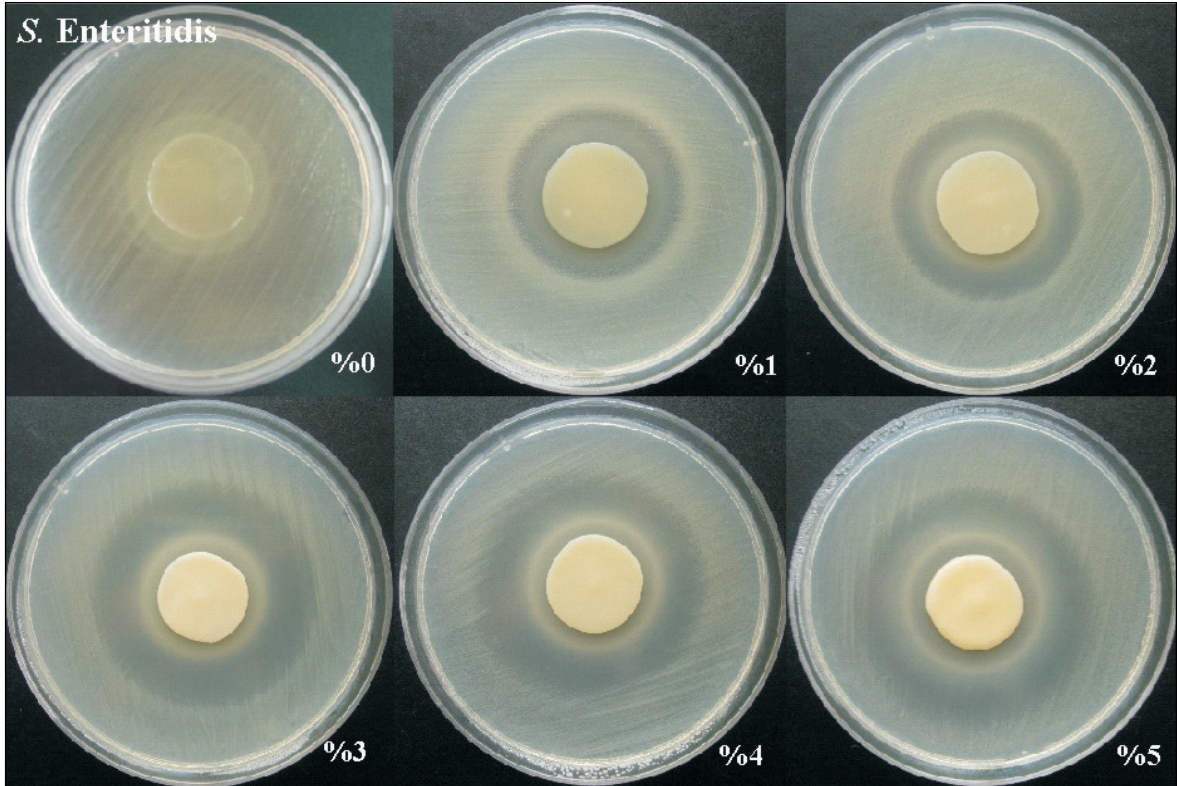


Şekil 1. Farklı konsantrasyonda (%1, 2, 3, 4, 5) bahçe kekiği uçucu yağı içeren soya proteini bazlı filmlerin test bakterilerine karşı gösterdiği inhibisyon zonları. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0.05$ )  
Figure 1. Inhibition zone diameters yielded by soy protein based edible film disks with various concentrations (0, 1, 2, 3, 4 and 5%) of thyme essential oil against test organisms. Bars with different superscript letters in each group are significantly different ( $P<0.05$ )





Şekil 2. Farklı konsantrasyonda (%1, 2, 3, 4, 5) mercanköşk uçucu yağı içeren soya proteini bazlı filmlerin test bakterilerine karşı gösterdiği inhibisyon zonları. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ( $P<0.05$ )  
 Figure 2. Inhibition zone diameters yielded by soy protein based edible film disks with various concentrations (0, 1, 2, 3, 4 and 5%) of oregano essential oil against test organisms. Bars with different superscript letters in each group are significantly different ( $P<0.05$ )

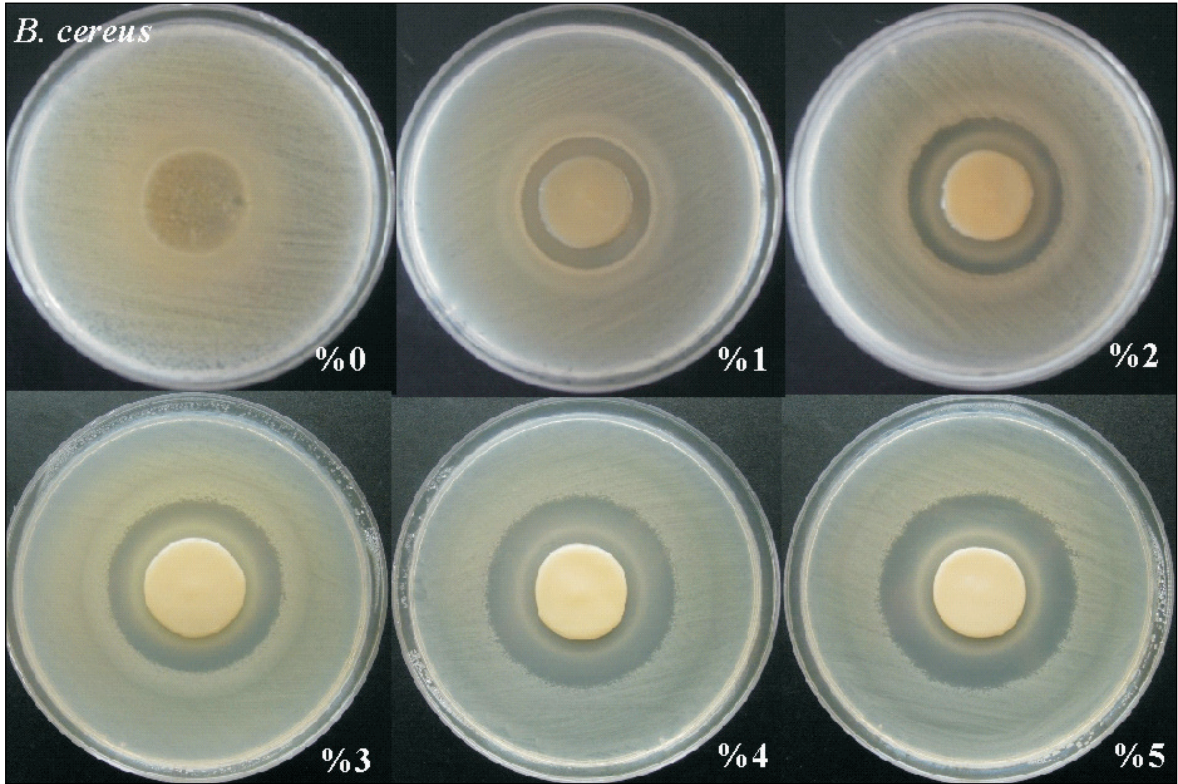


Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda mercanköşk uçucu yağı içeren soya proteini bazlı filmlerin *S. Enteritidis*'e karşı antibakteriyel aktivitesi  
 Figure 3. Antibacterial activity of soy protein edible films incorporated with various concentrations of oregano essential oil against *S. Enteritidis*

çapları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir (Şekil 2). T uçucu yağı için ise etkin antimikrobiyel aktivite düzeyi %5 olarak belirlenmiştir. T uçucu yağı içeren yenilebilir film disklerinde aynı grup içinde ortalamalar arasındaki fark konsantrasyon artışı ile beraber istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 1). Konsantrasyonlar arasında grup farkları değerlendirildiğinde ise, %3, %4 ve %5 konsantrasyonlar arasında O ve T uçucu yağlarının verdiği zon inhibisyon çapları arasındaki farklar önemli bulunmuş ( $P<0.05$ ) ve O uçucu yağının *L. monocytogenes* üzerinde T uçucu yağına göre daha etkili olduğu saptanmıştır. O uçucu yağı içeren yenilebilir film disklerinin *S. Enteritidis* için verdiği inhibisyon zon çapları incelendiğinde %1 ile %2 düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli olmazken ( $P>0.05$ ), %2 ile %3 konsantrasyonlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuş ( $P<0.05$ ) ve bu noktadan sonra konsantrasyon artışı etkinlik düzeyini değiştirmemiştir (Şekil 2, Şekil 3). Dolayısıyla %3 konsantrasyon

düzei *S. Enteritidis* için etkin antimikrobiyel aktivite değeri olarak tespit edilmiştir. T uçucu yağı sonuçları değerlendirildiğinde ise, %4 düzeyine kadar konsantrasyon arttıkça etkinliğin arttığı ve etkin antimikrobiyal aktivite düzeyinin %4 olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

*B. cereus* için, T uçucu yağını içeren filmlerden elde edilen inhibisyon zonu çapları arasındaki farkın %1, %2, %3 ve %4 konsantrasyonlar için önemli olduğu ( $P<0.05$ ) buna karşın %4 konsantrasyondan sonraki değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı ( $P>0.05$ ) belirlenmiştir (Şekil 1, Şekil 4). Diğer yandan, O uçucu yağı içeren filmlerin verdiği inhibisyon çapları incelendiğinde, %1 ile %2 konsantrasyondaki film disklerinin verdiği zon çapları arasındaki farkın önemli olduğu ( $P<0.05$ ) ve diğer konsantrasyonlar boyunca etkinin sabit kaldığı görülmektedir (Şekil 2). Aynı konsantrasyon arasındaki gruplar karşılaştırıldığında O ve T içeren filmlerin *B. cereus*'a karşı benzer antimikrobiyel etki gösterdikleri söylenebilir.



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda bahçe kekiği uçucu yağı içeren soya proteini bazlı filmlerin *B. cereus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi

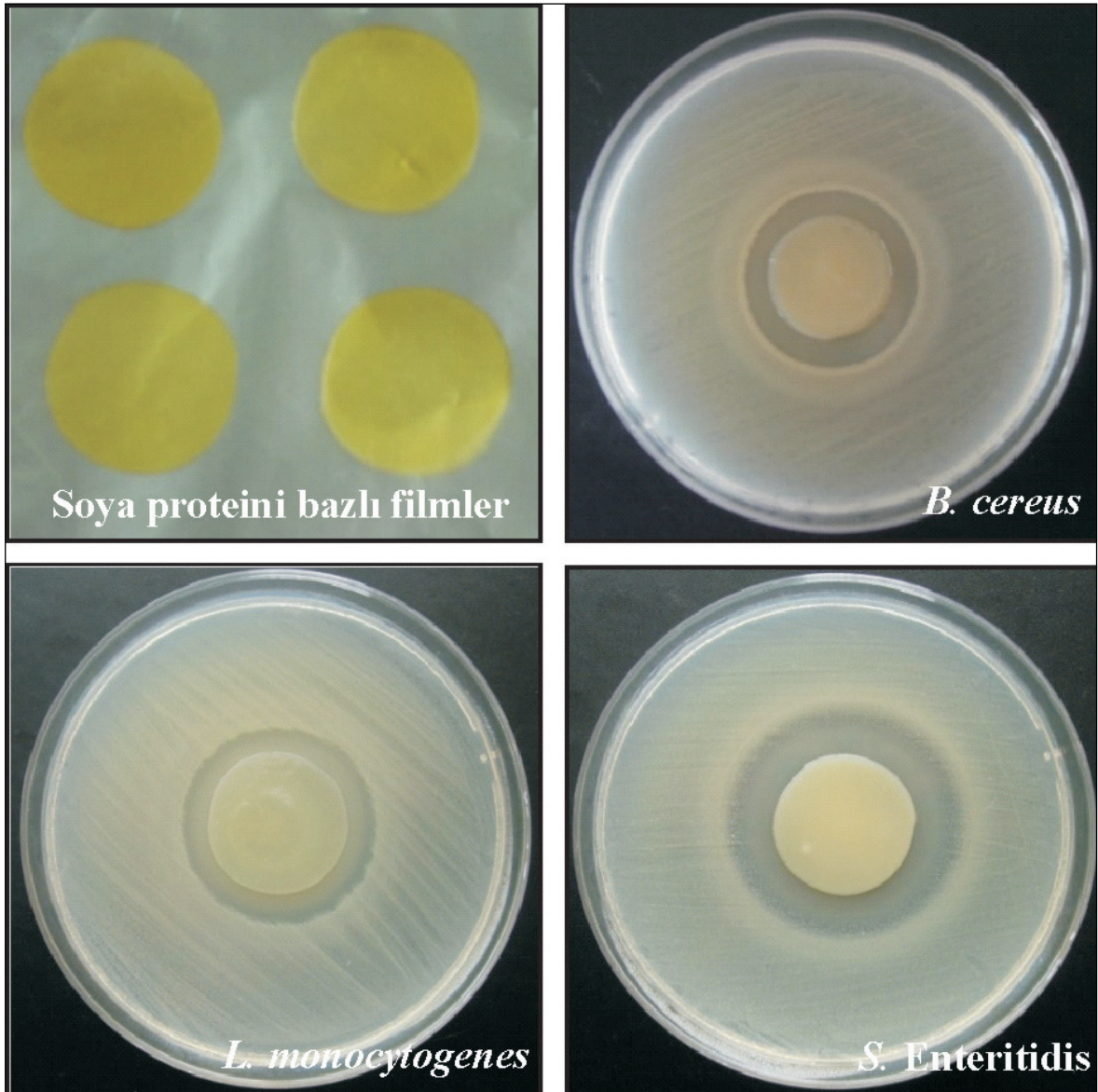
Figure 4. Antibacterial activity of soy protein edible films incorporated with various concentrations of thyme essential oil against *B. cereus*



Genel bir değerlendirme yapıldığında *S. Enteritidis* %1 konsantrasyonda T ve O içeren yenilebilir filmlere karşı sırasıyla 37 mm ve 38.5 mm inhibisyon zonu çapı ile en duyarlı bakteri olarak belirlenirken, bunu *L. monocytogenes* ve *B. cereus* izlemiştir (Şekil 5). Araştırmamızda diğer test bakterilerden elde edilen zon çapları kıyaslandığında *B. cereus*'un kekik uçucu yağına karşı daha dirençli olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ). Benzer şekilde, Jouki ve ark. (23) T uçucu yağı ilave edilmiş ayva çekirdeği jelinden üretilen yenilebilir filmlerin in-vitro

koşullarda antibakteriyel aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmada, %2 T uçucu yağı içeren filmlerin *S. Typhimurium*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7 ve *Y. enterocolitica*'ya karşı *B. cereus*'a kıyasla daha etkin olduğunu belirlemişlerdir.

Kekik uçucu yağında yüksek oranda bulunan fenolik bileşiklerden timol, karvakrol, p-simen ve  $\gamma$ -terpinen antimikrobiyel etkiden sorumlu bileşiklerdir. Kekik uçucu yağının antimikrobiyel etkisi, yapı ve fonksiyon değişikliği ile sitoplazma zarında görülmektedir. Sitoplazmik zarın seçici



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda bahçe kekliği uçucu yağı içeren soya proteini bazlı filmlerin *B. cereus*'a karşı antibakteriyel aktivitesi

Figure 4. Antibacterial activity of soy protein edible films incorporated with various concentrations of thyme essential oil against *B. cereus*

geçirgenliğinin kaybı çoğunlukla hücre ölümünün nedeni olarak belirtilmektedir. Yapılan araştırmalar genel olarak Gram pozitif bakterilerin bitkisel uçucu yağlara karşı Gram negatif bakterilere göre daha hassas olduğunu ortaya koymuştur. Gram negatif bakterilerin uçucu yağlara karşı olan direnci, hidrofobik bileşiklere karşı hücre içine girişi için bariyer özelliği gösteren hidrofilik dış membrana sahip olmaları ile ilişkilendirilmektedir (15, 24). O uçucu yağı ilavesi ile antibakteriyel özellik kazandırılmış aljinat filmlerinin etkinliğinin belirlendiği bir araştırmada, yukarıdaki literatür bilgisi ile uyumlu olarak, uçucu yağ içeren filmlerin Gram pozitif test bakterileri üzerine (*S. aureus*, *L. monocytogenes*) Gram negatif test bakterilerine kıyasla (*E. coli*, *S. Enteritidis*) daha etkin olduğu bildirilmiştir (25). Buna karşın araştırmamızda *S. Enteritidis*'in kekik uçucu yağına karşı diğer test bakterilerine göre daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu durumun nedeninin *S. Enteritidis* alt türlerine özgü direnç mekanizmalarının farklılığı ile ilgili olabileceği varsayılmaktadır.

Yapılan bu çalışma ile O ve T uçucu yağları ile antimikrobiyel özellik kazandırılmış olan soya bazlı yenilebilir filmlerin test edilen gıda kaynaklı patojenlere karşı etkinliği ortaya konmuştur. Yenilebilir filmlerle birlikte antimikrobiyel ajanların kullanıldığı çalışmaların çoğu model sistemlerle sınırlıdır. Özellikle doğal bitki ekstraktlarının biyobozunur ambalaj sistemlerinde kullanılma potansiyeline yönelik araştırmalar önem taşımaktadır. O ve T uçucu yağlarının soya proteini bazlı yenilebilir filmlerle birlikte gıdalarda kullanımı, gıda güvenliği ve raf ömrü açısından gelecek vadeden bir uygulamadır. Uçucu yağların yüksek konsantrasyonlarda kullanımının gıdalarda istenmeyen organoleptik değişikliklere yol açabileceği de dikkate alınarak yapılacak çalışmalar duyu analizler ile de desteklenmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Devlighere F, Vermeiren L, Debevere J. 2004. New preservation technologies: possibilities and limitations. *Int Dairy J*, 14, 273-285.
2. Vermeiren L, Devlighere F, Van Beest M, de Kruijff N, Debevere J. 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Sci and Techn*, 10, 77-86.
3. Ayana B, Turhan KN. 2010. Gıda ambalajlamasında antimikrobiyal madde içeren yenilebilir filmler/kaplamalar ve uygulamaları. *Gıda*, 35 (2), 151-158.
4. Gennadios A, Hanna MA, Kurth LB. 1997. Application edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *LWT - Food Sci Technol*, 30, 337-350.
5. Swain SN, Biswal SM, Nanda PK, Nayak PL. 2004. Biodegradable soy-base plastics: Opportunities and challenges. *J Polym Environ*, 12(1), 35-42.
6. Guillard V, Broyart B, Bonazzi C, Guilbert S, Gontard N. 2003. Preventing moisture transfer in a composite food using edible films: Experimental and mathematical study. *J Food Sci*, 68(7), 2267-2277.
7. Vermeiren L, Devlighere F, Debevere J. 2002. Effectiveness of some antimicrobial packaging concepts. *Food Addit Contam*, 19, 163-171.
8. Jouki M, Fazdi FT, Mortazavi SY, Koocheki A. 2014. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocoll*, 36, 9-19.
9. Fernández-Pan I, Royo M, Maté JI. 2012. Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. *J Food Sci*, 77, 383-390.
10. Min BJ, Oh JH. 2009. Antimicrobial activity of catfish gelatin coating containing origanum (*Thymus capitatus*) oil against gram-negative pathogenic bacteria. *J Food Sci*, 74, 143-148.
11. Seydim AC, Sarikus G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Res Int*, 39, 639-644.
12. Oussalah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L, Lacroix M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Agric Food Chem*, 52, 5598-5605.
13. Zivanovic S, Chi S, Draughon AF. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J Food Sci*, 70 (1), 45-50.
14. Paster, N, Juven BJ, Shaaya E. 1990. Inhibitory effects oregano and thyme essential oils on moulds and food born bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 11, 33-37.

15. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int J Food Microbiol*, 94, 223-253.
16. Sánchez-González L, Vargas M, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer, M. 2011. Use of essential oils in bioactive edible coatings. *Food Eng Rev*, 3, 1-16.
17. Silva N, Alves S, Gonçalves A, Amaral JS, Poeta P. 2013. Antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Sci Technol Int*, 19, 503-10.
18. Choi SG, Kim KM, Hanna MA, Weller CL, Kerr WL. 2003. Molecular dynamics of soy-protein isolate films plasticized by water and glycerol. *J Food Sci*, 68 (8), 2516-2522.
19. Zivanovic S, Chi S, Draughon AF. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J Food Sci*, 70 (1), 45-50.
20. Pranoto Y, Rakshit SK, Salokhe VM. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Sci Technol*, 38, 859-865.
21. Royo M, Fernandez-Pan I, Mate JI. 2010. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein film sor cellulose-based filter paper. *J Sci Food Agric*, 90, 1513-1519
22. Smith-Palmer A, Steward J, Fyfe L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol*, 26, 118-22.
23. Jouki M, Mortazavi SY, Fazdi FT, Koocheki A. 2014. Characterization of antioxidant-antibacterial quince seed mucilage films containing thyme essential oil. *Carbohydr Polym*, 99, 537-546.
24. Evren M ve Tekgüler B. 2011. Uçucu Yağların Antimikrobiyel Özellikleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 9(3), 27-40.
25. Benavides S, Villalobos-Carvajal R, Reyes JE. 2012. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *J Food Eng*, 110, 232-239.

## **ZEOLİT KATKILI AKTİF POLİETİLEN AMBALAJ MALZEMESİNİN KİVİ MEYVESİNİN KALİTE ÖZELLİKLERİ VE RAF ÖMRÜNE ETKİSİ**

**Elif Sezer<sup>1</sup>, Zehra Ayhan<sup>1\*</sup>, Telfun Çelikkol<sup>2</sup>, Füsün Güner<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Serdivan/Sakarya

<sup>2</sup>Koroza Ambalaj San. ve Tic. A.Ş., İstanbul

Geliş / Received: 15.12.2016; Kabul / Accepted: 14.01.2017; Online baskı / Published online: 08.02.2017

Sezer E., Ayhan, Z., Çelikkol, T., Güner, F. (2017). Zeolit katkıli aktif polietilen ambalaj malzemesinin kivi meyvesinin kalite özellikleri ve raf ömrüne etkisi. *GIDA* (2017) 42 (3): 277-286 doi: 10.15237/gida.GD16108

### **Öz**

Olgunlaşmış kivi meyvesi (*Actinidia deliciosa*, Hayward çeşidi) raf ömrünü uzatmak amacıyla zeolit katkıli polietilen (PE) torbalar kullanılarak pasif modifiye atmosfer koşullarında (%20.9 O<sub>2</sub>, %79 N<sub>2</sub>) ambalajlanmış ve 4 °C'de 20 gün depolanmıştır. Zeolit içermeyen PE torbalar ve ambalajsız örnekler kontrol örnekleri olarak belirlenmiş ve 0, 5, 10, 15 ve 20. günlerde kütle kaybı (%), tepe boşluğu gaz analizi (%O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>), fiziksel (renk ve tekstür (N)), kimyasal (briks, pH, titrasyon asitliği) ve duyu analizleri yapılmıştır. Kütle kaybı ambalajsız örneklerde 20. günde %4.18 iken, katkıli ve katkıli PE torbalarda %1'in altında kalmıştır. Kontrol torbalarında %O<sub>2</sub> oranı depolama süresince sürekli bir düşüş eğilimi göstermiş ve 20. günde %4 olarak tespit edilmiştir. Buna karşılık zeolit içeren torbalarda 5. günde oluşan %15 O<sub>2</sub> oranının sabitlenmesiyle depolamanın devamında denge atmosferi sağlanmıştır. %CO<sub>2</sub> oranının ise depolama süresince zeolit içermeyen torbalarda daha yüksek düzeylerde seyrettiği gözlemlenmiştir. 20. günde ambalajlı örneklerde titrasyon asitliği ambalajsız örneklere göre daha düşük, pH ise daha yüksek bulunmuş ( $P \leq 0.05$ ); briks değerlerinde istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ( $P > 0.05$ ). Duyusal değerlendirmelere göre 20. günde sadece zeolit katkıli PE ile ambalajlanmış kiviler renk, tekstür ve tat açısından kabul edilebilir bulunmuştur. Zeolit katkıli PE torbalarda kivi meyvesinin raf ömrü 4 °C'de en az 20 gün olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aktif ambalajlama, etilen tutucu, zeolit, raf ömrü, kivi meyvesi

## **EFFECT OF ZEOLITE ADDED ACTIVE PACKAGING MATERIAL ON THE QUALITY AND SHELF LIFE OF KIWIFRUIT**

### **Abstract**

Ripe kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) was packaged using zeolite incorporated polyethylene (PE) bags under passive modified atmosphere (20.9% O<sub>2</sub>, 79% N<sub>2</sub>) and stored at 4 °C for 20 days in order to extend the shelf life. PE bags with no zeolite and unpackaged samples were taken as the control groups, and weight loss (%), headspace gas analysis (O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>%), physical (color and texture (N)) and chemical analysis (brix, pH, titratable acidity (%)) and sensory evaluation were performed on 0, 5, 10, 15 and 20. days of storage. On the 20th day, the mass loss of unpackaged sample was 4.18% while it was less than 1% for zeolite added and control PE bags. O<sub>2</sub>% level in the control bags decreased continuously during increased storage down to 4% on the 20th day. However, equilibrium atmosphere was established around 15% O<sub>2</sub> at 5th day in zeolite added bags. CO<sub>2</sub> level was higher in control bags than that of zeolite added bags during storage. Titratable acidity in packaged samples was lower than unpackaged samples, and pH was higher in packaged fruits compared to unpackaged ones. However, there was no significant difference between packaged and unpackaged groups in terms of brix on the 20th day. Only kiwifruits packaged with active PE were acceptable in terms of sensorial color, texture and taste at the end of the storage. The shelf life of kiwifruit was suggested at least 20 days in zeolite-added PE bags at 4 °C.

**Keywords:** Active packaging, ethylene absorber, zeolite, shelf-life, kiwifruit

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ zehraayhan@sakarya.edu.tr,

☎ (+90) 264 295 38 58,

☎ (+90) 264 295 56 01

## GİRİŞ

Meyve ve sebzelerin insan sağlığı ve beslenmesi açısından önemi büyüktür. Taze meyve ve sebzelerin dayanımlarının artırılması amacıyla çeşitli yöntemlere başvurulur. Meyveler daha çok meyve suyu, reçel, marmelat, konserve vb. ürünlere işlenerek veya kurutma ile dayanıklı hale getirilir. Bunun yanında meyvelerin taze halde raf ömrünü artırmak amacıyla depolama ve ambalajlama koşullarında değişiklikler yapılması üzerine de çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir (1, 2). Günümüzde özellikle gıda dağıtımının küresel bir boyut kazanmasıyla birlikte gıda ambalajlama gerekli ve önemli bir duruma gelmiştir. Ambalajın görevlerinden biri de tüketim aşamasına kadar taze ürünlerin olabildiğince taze kalmasını, işlenmiş ürünlerin ise mevcut özelliklerinin en iyi şekilde korunmasını sağlamaktır. Bu nedenle gıdaların raf ömrünün uzatılmasında ambalajlama uygulamaları dikkat çekmektedir (3-5).

Kivi, düşük kalorili olmasıyla beraber vitamin ve mineraller yönünden zengin olması, bunun yanında yetiştirme ve pazarlama koşullarının avantajlı olması nedeniyle son yıllarda üretimi ve tüketimi hızla artan meyvelerden biri olmuştur (6). Kivinin *Actinidia* cinsi altında 50'ye yakın türü bulunmaktadır. Hayward çeşidi (*Actinidia deliciosa*), Dünya'da en çok yetiştirilen kivi çeşididir (%70-80) (7, 8). Hayward çeşidi kivinin üretimi ülkemizde son yıllarda hızla artış göstermiştir (9). Kivi meyvesi klimakterik meyvelerden olup, klimakterik meyvelerin olgunlaşma sürecinde etilen büyük rol oynamakta, etilen üretimi ile solunum hızı artmaktadır. Kivi tam olgunlaştığında çok az etilen üretir, ancak tüketim olgunluğuna erişmiş kivi meyvesi etilene karşı oldukça hassastır. Meyve 20 °C'de 1 ppm gibi çok düşük etilen miktarlarında bile birkaç saat içinde hızla olgunlaşma gösterir (8, 10). Kivinin etilen gazına olan bu hassasiyeti nedeniyle depolama ve ambalajlama koşullarında etilen gazına maruz kalmaması gereklidir (6, 11-13).

Meyve ve sebze grubu ürünlerin raf ömrünün uzatılmasında ürünün etilen gazı üretiminin baskılanması, üretilen etilenin ise ortamdan uzaklaştırılması en önemli hususlardan biridir. Bu tür gıdaların muhafazası ile ilgili çalışmaların büyük bir bölümünde kontrollü atmosferde depolama üzerine çalışılmış, ambalaj uygulamaları

ile ilgili çalışmalar sınırlı düzeyde kalmıştır (8, 13-18). Küçük (2006) tarafından yapılan çalışmada buzdolabı şartlarında (4 °C) 31 gün boyunca depolanan %5 ve %10 KMnO<sub>4</sub> emdirilmiş zeolit içeren ve içermeyen HDPE torbalarla ambalajlanan kivi örneklerinde bazı kalite özellikleri incelenmiştir. KMnO<sub>4</sub> emdirilmiş zeolit içeren ambalajlamada suda çözünür kuru madde (SÇKM), meyve sertliği ve C vitamini değerlerinin depolama boyunca daha yüksek oranda korunduğu bildirilmiştir (19). Hu ve ark. (2011) etilene maruz bırakılan *Actinidia deliciosa* türü kivi örneklerinde, 4 °C'de 42 günlük depolama periyodu boyunca nanokompozit bazlı ambalajlamanın (nano gümüş, nano-TiO<sub>2</sub> ve montmorillonit karışımı) hasat sonrası kalite özellikleri üzerine etkisini incelemişler, tüm depolama periyodu boyunca nanokompozit bazlı ambalajın polietilen kontrol ambalajına göre kalite özelliklerini daha yüksek oranda koruduğunu bildirmişlerdir (20).

Kivi meyvesinin raf ömrünün uzatılmasında çeşitli çalışmalar yapılmış olmakla birlikte bunların bir kısmı hasat sonrasındaki muhafaza koşullarında ürün kalitesini artırmaya diğer bir kısmı ise yeme olgunluğuna erişmiş olan kivi meyvesinin dayanımını artırmaya yöneliktir. Özellikle olgunlaşmış kivi meyvesinin dayanımı oldukça sınırlıdır. Yapılan bu çalışmada, pasif MAP altında zeolit katkılı PE ambalajlamanın, katkısız PE ambalaja ve ambalajsız uygulamaya göre 4 °C'de 20 günlük depolama ömrü boyunca kivi meyvesinin fizyolojik, fiziksel, kimyasal ve duyuşal özellikleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada Sakarya meyve sebze halinden tedarik edilen ortalama ağırlığı 100 g olan *Actinidia deliciosa* 'Hayward' çeşidi kivi meyveleri kullanılmıştır. Çalışmanın bir gün öncesinden laboratuvara getirilen kivi meyveleri 4 ± 1 °C'de depolanmıştır. Koroza Ambalaj San. ve Tic. A.Ş. (İstanbul) tarafından geliştirilen zeolit içeren düşük yoğunluklu polietilen (LDPE) torbalar ve katkısız LDPE torbalar ikili işbirliği kapsamında temin edilmiştir. Her iki ambalajın da ölçüleri 25 x 35 cm'dir. Oksijen geçiş hızı (OTR) katkısız LDPE malzemede 3303 cm<sup>3</sup> m<sup>2</sup> gün<sup>-1</sup>, zeolit katkılı LDPE malzemede 5664 cm<sup>3</sup> m<sup>2</sup> gün<sup>-1</sup>; su



buharı geçiş hızı (WVTR) katkısız LDPE malzemede  $5.24 \text{ g m}^{-2} \text{ gün}^{-1}$ , zeolit katkılı LDPE malzemede  $17.5 \text{ g m}^{-2} \text{ gün}^{-1}$ 'dir. Katkısız LDPE film 50 mikron, zeolit katkılı LDPE film ise 40 mikron kalınlığındadır. Katkılı malzeme %8-15 (a/a) oranında zeolit içermektedir.

### Yöntem

Kivi örnekleri ambalajsız (açık kontrol), katkısız-polietilen ambalajlı (ambalajlı kontrol) ve zeolit katkılı-ambalajlı olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Her ambalaja yaklaşık 1 kg kadar kivi tartılmıştır. Kivi içeren polietilen torbalar ısı kaynak makinesi (ME-400 CFN, Mercier Corporation, Tayvan) ile yapıştırılmıştır. Tüketici buzdolabı koşulları hedeflendiğinden örnekler %50 bağıl nemli ortamda  $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 20 gün bütün halde depolanmış ve 0, 5, 10, 15 ve 20. günlerde fizyolojik, fiziksel, kimyasal ve duyuşsal analizler yapılmıştır. Her analiz günü için her uygulamadan 2 paralel torba hazırlanmıştır. Analiz günleri için belirlenen örneklerden ayrı olarak kütle kaybı ölçümleri için her uygulamadan 3 paralel hazırlanmıştır.

### Kütle Kaybı (%)

Kütle kaybının belirlenmesi için her uygulamadan 3 paralel torba her analiz gününde  $\pm 0.1 \text{ g}$  duyarlılığındaki analitik terazi (Sartorius, GE 2101, Almanya) ile tartılmıştır. 5, 10, 15 ve 20. günlerde elde edilen tartım sonuçları 0. günde elde edilen tartım sonuçlarıyla karşılaştırılarak kütle kaybı % olarak belirlenmiştir. Her bir uygulama için 3 paralel örneğin tartımlarının ortalaması alınmıştır.

### Gaz Ölçümü

Torba ambalajların tepe boşluğu oksijen (%) ve karbondioksit (%) oranları gaz analizörü (Witt, Oxybaby, Almanya) ile belirlenmiştir. Üzerine septum yapıştirılan torba ambalajlara gaz analizörünün iğnesi ile girilerek tepe boşluğundaki gazın ölçümü yapılmıştır. Her bir uygulama için yapılan 4 ölçümün ortalaması alınmıştır.

### Fiziksel Analizler

Kivi örneklerinde renk ve tekstür ölçümleri yapılmıştır. Her iki analiz için de her ambalajdan

5 meyve alınarak her bir meyvenin karşılıklı iki farklı noktasından ölçüm yapılmıştır. Her bir uygulama için 20 ölçümün ortalaması alınmıştır. Renk ölçümünde CIE  $L^*a^*b^*$  ölçeğinde renk ölçüm cihazı (Lovibond RT 300, İngiltere) kullanılarak örneklerin öncelikle orta noktasından iki ölçüm yapılarak dış renk değerleri belirlenmiş, ardından ikiye kesilerek iç renk değerleri çekirdek kısmı ile kabuk kısmı arasındaki yeşil bölgeden ölçülmüştür. Meyve sertliğinin belirlenmesinde ise tekstür analiz cihazının (TA.XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, İngiltere) sıkıştırma (compression) programı ile kivilerin iki yüzeyinde orta noktalarından 4 mm çapında silindirik prop, 1 mm/s hız ve 7.5 mm penetrasyon mesafesi kullanılarak penetrasyon kuvveti (N) ölçülmüştür.

### Kimyasal Analizler

Kivi örneklerinde briks, pH ve titrasyon asitliği tayinleri yapılmıştır. Her paralelden 2 ölçüm yapılmış ve her bir uygulama için 4 ölçümün ortalaması alınmıştır. Kimyasal analizler için öncelikle her bir ambalajdan alınan en az 3 kivi örneği blender (Waring, Amerika) yardımıyla homojenize edilmiştir. Briks tayini için homojenize edilen kivi örnekleri filtre kağıdından geçirilmiş, refraktometre (Atago N-50, Japonya) ile çıkan meyve suyunun briksi ölçülmüştür. Titrasyon asitliği için homojenize edilen örnekten 20 g alınarak 200 ml'lik balon jodede saf su ile çizgisine tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiden 25 ml alınarak 0.1 N NaOH ile pH 8.1'e kadar titre edilmiş, elde edilen sarfiyattan % sitrik asit cinsinden titrasyon asitliği hesaplanmıştır. pH ölçümünde titrasyon asitliği için hazırlanan çözeltiden bir behere 20 ml alınarak pH metre (WTW pH 315i, Almanya) ile ölçüm yapılmıştır (21).

### Duyusal Değerlendirme

Renk, tat, tekstür ve genel beğeni eğitimli 6 panelist tarafından 1-5 skalasında değerlendirilmiştir. 3 puan ticari kabul edilebilirlik sınırı olarak belirlenmiştir. Renk değerlendirmesinde 1: yarı saydam (koyu yeşil), 5: opak (açık yeşil); tekstür değerlendirmesinde 1: çok yumuşak, 3: orta, 5: sıkı-sert; tat değerlendirmesinde 1: az yoğun, 3: orta, 5: çok yoğun; genel beğenide 1: hiç beğenmedim, 3: orta, 5: çok beğendim olarak belirlenmiştir.

### ***İstatistiksel Analiz***

Kivi örnekleri için ambalaj malzemesi, depolama süresi ve bu faktörlerin etkileşimlerinin ürünün kalite özelliklerine etkileri varyans analizleri (iki yönlü ANOVA) kullanılarak belirlenmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile %5 önem seviyesinde ve %95 güven aralığında değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde IBM SPSS 20 istatistik programı kullanılmıştır.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

### **Kütle Kaybı (%)**

Kütle kaybı meyve ve sebzeler açısından önemli bir kalite kriteridir. Meyvede kütle kaybının artışı ile ürün albenisi ve pazar kalitesi olumsuz etkilenmekle birlikte kütle azalmadan dolayı ekonomik açıdan da kayıp yaşanmaktadır (6). Kütle kaybı değerlerine bakıldığında 20. günde ambalajsız kivi örneklerinde %4.18 gibi bir oranda kayıp görülürken katkısız ve katkılı PE torbalarda kütle kaybının sırasıyla %0.10 ve %0.17 gibi düşük bir seviyede olduğu gözlemlenmiştir. 20. günde katkılı ve katkısız PE ambalajlı örneklerin kütle kaybı değerleri arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Mastromatteo ve ark. (2011) tarafından sodyum aljinat ile kaplanmış ve gerdirilmiş polipropilen (OPP) film ile pasif MAP şartlarında ambalajlanmış kivi örneklerinde 4 °C'de 13. günde %0.438-%0.575 aralığında kütle kaybı olduğu belirtilmiştir (22). Hu ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise kivi örneklerinde, 4 °C'de 21. günde kütle kaybı nanokompozit bazlı PE ambalaj ve kontrol PE ambalajın her ikisinde de yaklaşık %0.45 civarında bulunmuştur (20). Bu çalışmada katkılı ve katkısız PE ambalajlı örneklerden elde edilen kütle kaybı değerleri literatürde rapor edilen değerlerden daha düşüktür. Kütle kaybının düşük olması kullanılan PE bazlı malzemelerin nem geçirgenliğinin düşük olması ile ilişkilendirilebilir. Genellikle ambalajsız olarak satışa sunulan kivin kütle kaybının %4 civarında olması ise önemli bir ekonomik kayba işaret etmektedir.

### **Tepe Boşluğu O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> Oranları (%)**

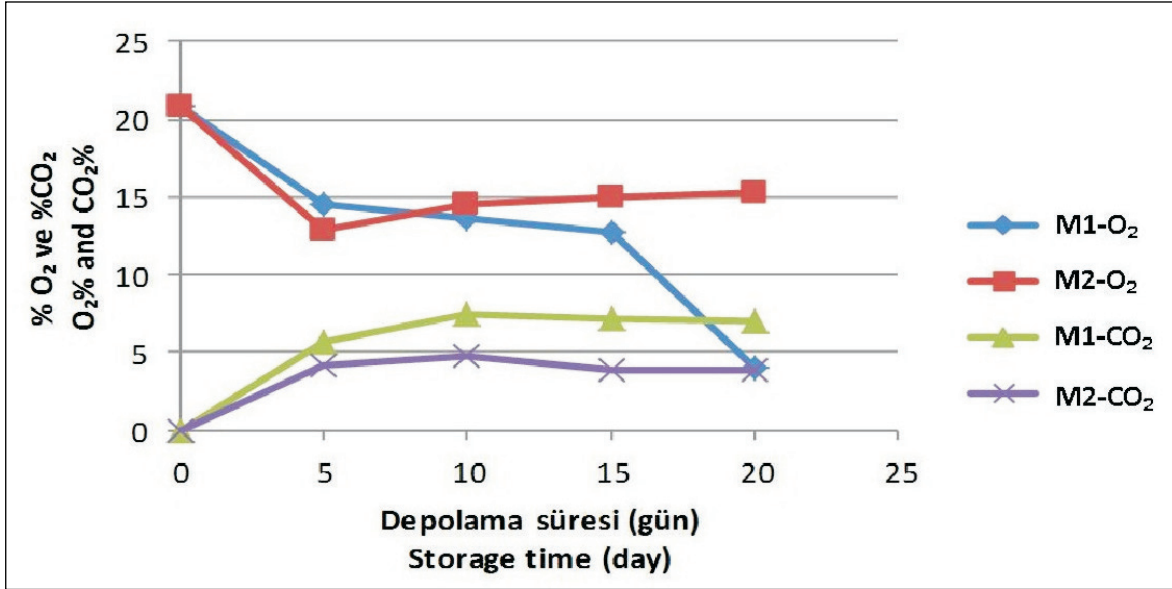
Katkısız PE torbalarda %O<sub>2</sub> oranı depolama süresince sürekli azalma göstermiş, katkılı PE torbalarda ise depolamanın ilk gününe göre 5.

günde bir düşüş olmakla birlikte bu günden sonra sabitlenmiş ve denge atmosferi oluşmuştur (Şekil 1). Zeolit katkılı PE torbalarda 20. günde ölçülen O<sub>2</sub> oranının (%15.3) katkısız PE torbalara göre (%4.0) daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. CO<sub>2</sub> değerlerine bakıldığında ise 20. günde katkılı PE torbalardaki CO<sub>2</sub> oranının (%3.8) katkısız PE torbalardaki CO<sub>2</sub> oranına (%7.0) göre daha düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Rocculi ve ark. (2005)'nin yaptıkları çalışmada 200 µm kalınlığında polipropilen filmle 4 °C'de normal atmosfer koşulları altında ambalajlanan kivilerde 12. günde ambalaj içindeki O<sub>2</sub> miktarı %0.25'e düşerken, CO<sub>2</sub> miktarı %54.60'a çıkmıştır (16). Mastromatteo ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada ise pasif MAP koşullarında, 20 µm OPP film ile ambalajlanan ve 4 °C'de depolanan 'Hayward' çeşidi kivilerde ürün solunumuna bağlı olarak benzer şekilde O<sub>2</sub> miktarında düşüş, CO<sub>2</sub> miktarında ise artış gözlemlenmiş, 13. günde O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> oranları sırasıyla yaklaşık olarak %7 ve %6 civarında ölçülmüştür. Pasif MAP uygulamasında hedeflenen normal atmosfer koşullarına göre O<sub>2</sub> oranının belirli bir orana düşerek sabitlenmesi, CO<sub>2</sub> oranının da artarak belirli bir oranda sabitlenmesi ile denge atmosferinin kurulmasıdır. Zeolit katkılı PE ambalaj denge atmosferinin kurulmasında, özellikle O<sub>2</sub> oranının dengede tutulmasında katkısız PE ambalaja göre daha başarılı sonuç vermiştir. Katkısız PE malzemede CO<sub>2</sub> oranının depolama boyunca katkılı malzemeye kıyasla daha fazla yükselmesi malzeme gaz geçirgenliğinin (CO<sub>2</sub>) daha düşük olması ile ilişkilendirilmiştir. Depolamada denge atmosferine daha erken ulaşılması ürün solunumunun daha kısa sürede kontrol altına alınarak raf ömrünün uzatılmasını sağlamaktadır.

### **Fiziksel Kalite**

#### **Renk (L\*, a\*, b\*)**

Kivi örneklerinin dış renk L\* (0:siyah, 100:beyaz), a\* (-60:yeşil, +60:kırmızı) ve b\* (-60:mavi, +60:sarı) değerlerinin yer aldığı Çizelge 1'e bakıldığında, parlaklığı ifade eden L\* değeri dış kabukta 20 günlük depolama süresi boyunca kontrol örneklerinde değişim göstermekle birlikte, katkılı PE torbada önemli bir değişim olmadığı görülmektedir. 20. günde ambalajlı ve ambalajsız tüm örneklerin L\* değerleri arasında önemli bir



Şekil 1. Kivi meyvesinde katkısız PE (M1) ve zeolit katkılı PE (M2) ambalaj malzemelerinin soğuk depolama süresince tepe boşluğu oksijen ve karbondioksit oranlarına (%) etkisi

Figure 1. Effect of control PE with no zeolite (M1) and PE with zeolite (M2) packaging materials on the headspace oxygen and carbon dioxide levels (%) of kiwifruit during cold storage period

fark bulunmamaktadır ( $P>0.05$ ). Dış kabukta kırmızılığı ifade eden  $a^*$  ve sarılığı ifade eden  $b^*$  değerlerinde de 20. günde örnekler arasında önemli düzeyde bir farklılık görülmemiştir ( $P>0.05$ ). Genel olarak kivi meyvelerinde olgunlaşma ile meyvenin dış görünüşünde önemli bir değişiklik

olmadığı, kabuğun parlak ve kahverengi tüylerini koruduğu, meyve içinin de parlak yeşil olduğu, olgunlaşma aşamasında hafif yumuşama başladığı bildirilmektedir (8). Bununla birlikte olgunlaşma boyunca iç renkte değişiklikler gözlenebileceği de belirtilmektedir (20).

Çizelge 1. Farklı ambalaj malzemelerinin soğuk depolamada kivi meyvesinin dış renk ( $L^*a^*b^*$ ) değerlerine etkisi  
Table 1. Effect of different packaging materials on external color values ( $L^*a^*b^*$ ) of kiwifruit during cold storage period

	Dış Renk ( $L^*$ ) External Color ( $L^*$ )				
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	47.70±2.12 <sup>Aab</sup>	48.61±2.37 <sup>Aa</sup>	47.63±1.73 <sup>Aab</sup>	45.08±2.11 <sup>Bc</sup>	46.69±2.10 <sup>Ab</sup>
M1	47.70±2.12 <sup>Aa</sup>	45.81±2.20 <sup>Bb</sup>	46.07±2.42 <sup>Ab</sup>	46.61±2.38 <sup>ABab</sup>	45.69±2.09 <sup>Ab</sup>
M2	47.70±2.12 <sup>Aa</sup>	46.09±2.15 <sup>Ba</sup>	46.36±2.91 <sup>Aa</sup>	47.01±2.88 <sup>Aa</sup>	46.06±2.26 <sup>Aa</sup>

	Dış Renk ( $a^*$ ) External Color ( $a^*$ )				
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	8.45±1.57 <sup>Aab</sup>	7.75±1.43 <sup>Bb</sup>	8.57±1.57 <sup>Ab</sup>	8.91±0.92 <sup>Aa</sup>	8.92±1.45 <sup>Aa</sup>
M1	8.45±1.57 <sup>Aa</sup>	7.94±1.51 <sup>Ab</sup>	8.75±1.48 <sup>Aa</sup>	8.76±1.52 <sup>Aa</sup>	8.86±0.85 <sup>Aa</sup>
M2	8.45±1.57 <sup>Aab</sup>	8.74±1.10 <sup>Ab</sup>	9.39±1.51 <sup>Aa</sup>	8.08±1.56 <sup>Ab</sup>	9.25±1.40 <sup>Aa</sup>

	Dış Renk ( $b^*$ ) External Color ( $b^*$ )				
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	27.56±1.61 <sup>Aa</sup>	27.79±2.36 <sup>Aa</sup>	28.13±2.27 <sup>Aa</sup>	24.96±2.32 <sup>Cb</sup>	27.57±1.68 <sup>Aa</sup>
M1	27.56±1.61 <sup>Ab</sup>	26.37±2.95 <sup>Ab</sup>	27.89±2.32 <sup>Ab</sup>	30.54±2.75 <sup>Aa</sup>	27.96±2.54 <sup>Ab</sup>
M2	27.56±1.61 <sup>Aa</sup>	27.65±1.30 <sup>Aa</sup>	27.77±2.39 <sup>Aa</sup>	28.12±2.37 <sup>Ba</sup>	27.42±1.98 <sup>Aa</sup>

<sup>Aa</sup> Her bir kolonda, aynı büyük harfler uygulamalar arasında  $P\leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. Her bir satırda aynı küçük harfler her bir uygulama için depolama süresi açısından  $P\leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. K1: Ambalajsız kontrol, M1: Zeolit katkısız PE, M2: Zeolit katkılı PE

<sup>Aa</sup> For each column, similar capital letters are not significantly different at  $P\leq 0.05$  among applications. For each application, similar small letters in rows are not significantly different at  $P\leq 0.05$ . K1: Unpackaged control, M1: Control PE with no zeolite, M2: PE with zeolite.



Kivi meyvesinin çekirdekleri arasında transparan bir yapı görülmektedir. Olgunlaşmanın devam etmesiyle meyvenin çekirdeği ile kabuğu arasındaki meyve eti kısmı da zamanla transparan bir hale dönüşmektedir. Transparan yapının artışı kivinin görsel beğenisini olumsuz yönde etkilemektedir, bu sebepten ötürü kivi meyvesi açısından iç renk değeri özellikle de transparan yapı oluşumu önemli bir kalite kriteridir (23, 24). Çizelge 2'de yer alan iç renk L\*, a\* ve b\* değerlerine bakıldığında 20. günde 0. güne kıyasla ambalajlı ve ambalajsız tüm örneklerin L\*, a\* ve b\* değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmadığı görülmüştür ( $P>0.05$ ). Rocculi ve ark. (2005) tarafından yapılan çalışmada tüm kivi örneklerinde L\* değerlerinde depolama boyunca düşüş gözlenmiştir. Aynı zamanda tekstürde yumuşama ile L\* değerleri arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu rapor edilmiştir (16). Daha önceki çalışmalarda da kivinin tekstür değişimlerinin rengi etkilediği görülmüştür (16, 25). Küçük (2006) tarafından yapılan çalışmada ise 4 °C'de 31. günlük muhafaza süresi boyunca  $KMnO_4$  emdirilmiş zeolit içeren paketlemenin kontrol paketlemeye göre L\*, a\* ve b\* değerleri üzerinde önemli bir değişime neden olmadığı saptanmıştır (19). Hasattan sonra klorofil kaybının düşük sıcaklıkta bile ilerlediği, uzun süre depolanan meyve ve sebzelerde yeşil rengin kaybolduğu,

ayrıca etilenin klorofil kaybını hızlandırdığı belirtilmektedir (19, 26). İç rengin fazla bir değişime uğramaması ise olgunlaşmanın yavaş bir seyir izlemesi ile ilişkilendirilebilir.

### Tekstür (Penetrasyon Kuvveti, N)

Kivi meyvesinde ölçülen penetrasyon kuvveti (N) değerleri üründeki sertlik-yumuşaklık hakkında bilgi vermektedir. Tüm örneklerin depolama süresi boyunca sertlik değerlerinde önemli derecede bir düşüş görülmüştür (Çizelge 3). Katkılı PE ambalaj 10. günde sertlik değeri bakımından ambalajsız kontrole göre daha yüksek iken 20. günde penetrasyon kuvveti (N) değerleri bakımından örnekler arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir ( $P>0.05$ ).

Kivide olgunlaşmayla birlikte meyve eti sertliğinin giderek azaldığı, bu azalmanın birçok enzimin kontrolünde olan pektin metabolizmasındaki etkinlikten ileri geldiği vurgulanmaktadır (17). Ben-Arie ve ark. (1982) tarafından kivilerin depolanma periyodu boyunca olgunlaşmasındaki değişimler üzerine yapılan çalışmada hasattan sonra meyve sertliğinin zamanla azaldığı gözlemlenmiştir (27). Meyve ve sebzelerin yumuşama hızının esasında doğrudan pektik maddelerin parçalanma hızı ile orantılı olduğu, pektinlerin parçalanmasında rol alan en önemli enzimin ise pektin esteraz olduğu bilinmektedir.

Çizelge 2. Farklı ambalaj malzemelerinin soğuk depolamada kivi meyvesinin iç renk (L\*a\*b\*) değerlerine etkisi  
Table 2. Effect of different packaging materials on internal color values (L\*a\*b\*) of kiwifruit during cold storage period

İç Renk (L*) Internal Color (L*)					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	50.66±2.87 <sup>Aa</sup>	49.28±4.02 <sup>Ab</sup>	47.35±4.96 <sup>Ab</sup>	49.39±2.34 <sup>Ab</sup>	49.74±1.59 <sup>Aa</sup>
M1	50.66±2.87 <sup>Aa</sup>	48.32±4.02 <sup>Aa</sup>	49.24±3.52 <sup>Aa</sup>	50.80±1.85 <sup>Aa</sup>	49.37±5.06 <sup>Aa</sup>
M2	50.66±2.87 <sup>Aa</sup>	48.54±4.06 <sup>Ab</sup>	49.94±3.60 <sup>Aa</sup>	46.99±3.98 <sup>Bb</sup>	48.78±4.09 <sup>Ab</sup>
İç Renk (a*) Internal Color (a*)					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	-6.68±0.80 <sup>Ab</sup>	-6.03±1.73 <sup>Aa</sup>	-6.24±1.21 <sup>Ab</sup>	-7.03±1.01 <sup>Bb</sup>	-6.39±0.83 <sup>ABab</sup>
M1	-6.68±0.80 <sup>Aa</sup>	-6.79±1.02 <sup>Ab</sup>	-5.53±3.02 <sup>Aa</sup>	-5.89±1.33 <sup>Ab</sup>	-6.77±1.04 <sup>Bb</sup>
M2	-6.68±0.80 <sup>Ab</sup>	-6.72±1.08 <sup>Ab</sup>	-6.49±0.93 <sup>Ab</sup>	-6.34±0.89 <sup>ABab</sup>	-5.83±1.06 <sup>Aa</sup>
İç Renk (b*) Internal Color (b*)					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	22.66±1.69 <sup>Ab</sup>	21.11±4.35 <sup>Ab</sup>	21.69±3.43 <sup>Ab</sup>	24.13±2.64 <sup>Aa</sup>	22.64±1.98 <sup>ABab</sup>
M1	22.66±1.69 <sup>Ab</sup>	22.41±3.16 <sup>Ab</sup>	22.02±2.64 <sup>Ab</sup>	21.07±3.64 <sup>Bb</sup>	23.97±3.49 <sup>Aa</sup>
M2	22.66±1.69 <sup>Ab</sup>	21.75±3.66 <sup>Ab</sup>	23.24±2.36 <sup>Aa</sup>	21.00±2.12 <sup>Bb</sup>	21.08±2.64 <sup>Bb</sup>

<sup>Aa</sup> Her bir kolonda, aynı büyük harfler uygulamalar arasında  $P\leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. Her bir satırda aynı küçük harfler her bir uygulama için depolama süresi açısından  $P\leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. K1: Ambalajsız kontrol, M1: Zeolit katkısız PE, M2: Zeolit katkılı PE

<sup>Aa</sup> For each column, similar capital letters are not significantly different at  $P\leq 0.05$  among applications. For each application, similar small letters in rows are not significantly different at  $P\leq 0.05$ . K1: Unpackaged control, M1: Control PE with no zeolite, M2: PE with zeolite.

Hasattan sonra pektin esteraz aktivitesi yükselmekte ve meyve ve sebzelerin yumuşamasına sebep olmaktadır (19, 28). Yapılan bu çalışmada depolama süresi sonunda ambalajsız örneklerin penetrasyon kuvvetinin (N) ambalajlı örnekler yakın çıkmış olması, ambalajsız örneklerde kütle kaybına bağlı olarak kabukta oluşan büzülme ve buruşmalar nedeniyle penetrasyon kuvvetinin (N) arttığı yönündedir. Ancak duyuşal değerlendirmede ambalajsız kivi tekstürünün ambalajlı örneklerden daha yumuşak olduğu da tespit edilmiştir.

### Kimyasal Kalite

#### Briks (%)

Çizelge 4'te yer alan briks (%) değerlerine bakıldığında katkılı PE ambalajlı ve ambalajsız örneklerin briks (%) değerlerinde depolama süresi boyunca önemli bir değişim olmadığı, katkısız PE ambalajlı örnekte ise depolama süresince briks (%) değerinde 0. güne göre azalma olduğu görülmüştür. Depolama sonunda ise (20. gün) ambalajlı ve ambalajsız örneklerin briks (%) değerleri arasında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı gözlenmiştir ( $P>0.05$ ). *Actinidia deliciosa* 'Hayward' gibi yeşil meyve etli kivilerde olgunlaşma boyunca nişasta parçalanması olduğu belirtilmektedir (8, 29). Kivi meyvelerinin en uygun yeme olumuna ulaştıkları suda çözünür kuru madde oranının %12 olduğu bildirilmektedir (8, 30). Çalışmada 20 gün boyunca briks değerlerinde önemli bir değişiklik olmaması örneklerin olgunlaşmasının oldukça yavaş bir düzeyde seyrettiği şeklinde yorumlanabilir.

#### pH

pH değerleri bakımından genel olarak ambalajlı örneklerde depolama süresi boyunca çok düşük düzeyde bir artış, ambalajsız kontrol örneğinde

ise bir düşüş gözlenmiştir (Çizelge 4). 20. günde katkısız ve katkılı PE torbaların pH değerleri (sırasıyla 3.69 ve 3.68) arasında fark görülmemiş, ambalajsız kontrol örneğinin pH değeri (3.57) ise ambalajlı örneklerden daha düşük bulunmuştur ( $P\leq 0.05$ ). Meyvenin olgunluğunun ilerlemesine bağlı olarak birçok meyvede genellikle asitliğin azaldığı, pH düzeyinde ise artış meydana geldiği bilinmektedir (6, 31). Genel olarak meyve olgunlaşmasının beraberinde pH'da değişim yaşanacağı göz önüne alındığında; bu çalışmada depolama boyunca ambalajlı örneklerin pH değerlerinde önemli düzeyde değişim olmaması ürün olgunlaşmasının kontrol altında olduğunun bir göstergesi olarak düşünülebilir.

#### Titrasyon asitliği (%)

Titrasyon asitliği (%) değerleri Çizelge 4'de yer almaktadır. Titrasyon asitliği (%) değerleri, pH değerlerinin tersine ve bu değerlere uyumlu olarak katkısız ve katkılı PE torbalarda (sırasıyla %1.13 ve %0.99) ambalajsız kontrol örneğine (%1.36) göre daha düşüktür ( $P\leq 0.05$ ). Kivi meyvesinin depolama periyodu boyunca asitliğindeki düşüş beklenen bir durum olmakla beraber, yapılan çalışmalarda bu düşüşün mümkün olduğunca az bir eğilim göstermesini sağlamak ve bu sayede meyvenin muhafaza kalitesini korumak amaçlanır (6). Asitlik (%) değerlerinin korunması bakımından katkılı PE ambalajla katkısız PE ambalaj arasında önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ( $P>0.05$ ).

#### Duyusal Değerlendirme

Kivi meyvelerinde duyuşal renk, tekstür, tat ve genel ürün beğenisi puanlarının yer aldığı Çizelge 5'e bakıldığında katkılı PE torbanın 20. günde kabul edilebilirlik sınırı olan 3'ün altına düşmediği

Çizelge 3. Farklı ambalaj malzemelerinin soğuk depolamada kivi meyvesinde penetrasyon kuvvetine (N) etkisi  
Table 3. Effect of different packaging materials on penetration force (N) of kiwifruit during cold storage period

	Penetrasyon Kuvveti (N) Penetration Force (N)				
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	24.94±2.77 <sup>Aa</sup>	25.28±4.34 <sup>Aa</sup>	20.75±3.96 <sup>Bb</sup>	24.78±3.55 <sup>Aa</sup>	18.15±2.81 <sup>Ac</sup>
M1	24.94±2.77 <sup>Aa</sup>	21.09±4.58 <sup>Bbc</sup>	21.96±5.50 <sup>ABbc</sup>	22.82±5.45 <sup>Ab</sup>	19.12±2.92 <sup>Ac</sup>
M2	24.94±2.77 <sup>Aa</sup>	23.10±5.80 <sup>ABa</sup>	23.92±3.63 <sup>Aa</sup>	19.75±1.59 <sup>Bb</sup>	19.40±2.66 <sup>Ab</sup>

<sup>Aa</sup> Her bir kolonda, aynı büyük harfler uygulamalar arasında  $P\leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. Her bir satırda aynı küçük harfler her bir uygulama için depolama süresi açısından  $P\leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. K1: Ambalajsız kontrol, M1: Zeolit katkısız PE, M2: Zeolit katkılı PE

<sup>Aa</sup> For each column, similar capital letters are not significantly different at  $P\leq 0.05$  among applications. For each application, similar small letters in rows are not significantly different at  $P\leq 0.05$ . K1: Unpackaged control, M1: Control PE with no zeolite, M2: PE with zeolite.

Çizelge 4. Farklı ambalaj malzemelerinin soğuk depolamada kivi meyvesinin briks (%), pH ve titrasyon asitliği (%) değerlerine etkisi  
 Table 4. Effect of different packaging materials on brix (%), pH and titratable acidity (%) of kiwifruit during cold storage period

Briks (%) Brix (%)					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	13.45±0.41 <sup>Aa</sup>	13.25±1.56 <sup>Aa</sup>	13.45±0.17 <sup>Aa</sup>	13.13±0.43 <sup>Aa</sup>	13.38±0.51 <sup>Aa</sup>
M1	13.45±0.41 <sup>Aa</sup>	12.63±0.49 <sup>Abc</sup>	12.75±0.37 <sup>Bab</sup>	11.98±0.34 <sup>Bc</sup>	12.53±0.67 <sup>Abc</sup>
M2	13.45±0.41 <sup>Aa</sup>	13.03±0.17 <sup>Aa</sup>	13.18±0.32 <sup>ABa</sup>	12.58±0.55 <sup>ABa</sup>	12.73±0.90 <sup>Aa</sup>
pH					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	3.62±0.05 <sup>Aab</sup>	3.48±0.04 <sup>Ac</sup>	3.70±0.05 <sup>Aa</sup>	3.65±0.12 <sup>Aab</sup>	3.57±0.04 <sup>Bbc</sup>
M1	3.62±0.05 <sup>Ac</sup>	3.48±0.02 <sup>Ad</sup>	3.63±0.03 <sup>Bc</sup>	3.74±0.00 <sup>Aa</sup>	3.69±0.01 <sup>Ab</sup>
M2	3.62±0.05 <sup>Aab</sup>	3.55±0.05 <sup>Ab</sup>	3.65±0.04 <sup>ABab</sup>	3.64±0.04 <sup>Aab</sup>	3.68±0.11 <sup>ABa</sup>
Titrasyon Asitliği (%) Titratable Acidity (%)					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	1.28±0.09 <sup>Aa</sup>	1.26±0.06 <sup>Aa</sup>	1.23±0.05 <sup>Aab</sup>	1.10±0.16 <sup>Ab</sup>	1.36±0.02 <sup>Aa</sup>
M1	1.28±0.09 <sup>Aa</sup>	1.11±0.07 <sup>Bbc</sup>	1.20±0.03 <sup>ABa</sup>	1.05±0.01 <sup>Ac</sup>	1.13±0.12 <sup>Bbc</sup>
M2	1.28±0.09 <sup>Aa</sup>	1.21±0.06 <sup>ABa</sup>	1.05±0.07 <sup>Bbc</sup>	1.19±0.12 <sup>Aab</sup>	0.99±0.14 <sup>Bc</sup>

<sup>Aa</sup> Her bir kolonda, aynı büyük harfler uygulamalar arasında  $P \leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. Her bir satırda aynı küçük harfler her bir uygulama için depolama süresi açısından  $P \leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. K1: Ambalajsız kontrol, M1: Zeolit katkısız PE, M2: Zeolit katkılı PE

<sup>Aa</sup> For each column, similar capital letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$  among applications. For each application, similar small letters in rows are not significantly different at  $P \leq 0.05$ . K1: Unpackaged control, M1: Control PE with no zeolite, M2: PE with zeolite.

izlenmiştir. Bunun yanında kontrol örnekleri 20. günde kabul edilebilir sınırın altında kalmıştır. İncelenen tüm duyuşal niteliklerde 20. günde en yüksek puanları katkılı PE ile ambalajlı örnekler almıştır. Gözlenen bu sonuçlar katkılı PE ile ambalajlı örneklerin 20 gün depolanabileceğini göstermektedir. Küçük (2006) tarafından %5 ve %10  $\text{KMnO}_4$  emdirilmiş zeolit içeren ve içermeyen HDPE torbalarla ambalajlanan kivi örneklerinde 2. haftada yapılan duyuşal analiz sonuçlarına göre %10  $\text{KMnO}_4$ 'lı zeolitlerle paketlenen örneklerin diğer örneklere göre daha sert bulunduğu, renk değerlendirmesi açısından ise örnekler arasında önemli bir fark bulunmadığı ifade edilmiştir (19). Depolama süresinin sonuna kadar duyuşal renk, tekstür, tat ve genel beğeni açısından en beğenilen örneğin katkılı PE ambalajlı örnek olması, bu uygulamanın duyuşal kaliteyi koruması açısından daha uygun olduğunu göstermektedir.

## SONUÇ

Ambalajsız kivi örneklerinde ekonomik açıdan önemli sayılacak düzeyde kütle kaybının ortaya çıkması, kivi meyvesinin ambalajlı olarak muhafazasına gereksinim olduğunu ortaya

koymaktadır. Zeolit katkılı PE ambalaj ile istenilen denge gaz atmosferine depolamanın 5. gününde ulaşılması ile solunumun kontrol altına alındığı ve bu sebeple fiziksel ve kimyasal özelliklerde çok büyük değişim ortaya çıkmadığı tespit edilmiştir. Katkılı PE ambalajlı örnekler ile kontrol örnekleri arasında en önemli fark duyuşal özelliklerde ortaya çıkmıştır ve bu fark raf ömrü açısından belirleyici olmuştur. Ambalajlı ve ambalajsız kontrol örneklerinin raf ömrü 15 günle sınırlı kalırken katkılı PE ambalajlı örneklerin en az 20 günlük raf ömrüne sahip oldukları görülmüştür.

## TEŞEKKÜR

Çalışmaya katkılarından dolayı Korozo Ambalaj San. ve Tic. A.Ş.'ye (İstanbul) ve laboratuvar denemelerine yardımcı olan yüksek lisans öğrencileri Elif Postoğlu, Meliha Öztürk ve Tuncay Tiribolulu'ya teşekkür ederiz.

Bu makale, aniden ve çok erken kaybettığımız ve gıda ambalajlama alanında çok büyük emekleri olan, bu çalışmanın gerçekleştirildiği ambalajlama laboratuvarının kurulmasında da önemli katkıları olan Muharrem Demir'in anısına atfedilmiştir.

Çizelge 5. Farklı ambalaj malzemelerinin soğuk depolamada kivi meyvesinin duyuşsal renk, tekstür, tat ve genel beğenisi üzerine etkisi  
Table 5. Effect of different packaging materials on sensorial color, texture, taste and general acceptability of kiwifruit during cold storage period

Renk Color					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.33±1.03 <sup>Ab</sup>	3.67±1.03 <sup>Ab</sup>	3.67±1.03 <sup>Ab</sup>	2.67±0.82 <sup>ABb</sup>
M1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.17±1.17 <sup>Ab</sup>	3.83±0.75 <sup>Ab</sup>	3.67±0.82 <sup>Ab</sup>	2.17±0.75 <sup>Bc</sup>
M2	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.33±0.82 <sup>Ab</sup>	3.83±0.75 <sup>Ab</sup>	4.00±0.89 <sup>Ab</sup>	3.33±0.82 <sup>Ab</sup>
Tekstür Texture					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.67±0.82 <sup>ABb</sup>	3.17±0.75 <sup>Ab</sup>	3.83±0.75 <sup>ABb</sup>	2.17±0.75 <sup>Bc</sup>
M1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.00±0.63 <sup>Bbc</sup>	3.67±0.82 <sup>Ab</sup>	2.83±0.98 <sup>Bbc</sup>	2.33±0.82 <sup>ABc</sup>
M2	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	4.00±0.63 <sup>Abc</sup>	3.83±0.98 <sup>Abc</sup>	4.17±0.75 <sup>Aab</sup>	3.17±0.75 <sup>Ac</sup>
Tat Taste					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.50±1.05 <sup>ABbc</sup>	3.67±0.82 <sup>abc</sup>	4.17±0.75 <sup>Aab</sup>	2.67±1.03 <sup>Ac</sup>
M1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.00±1.26 <sup>Bbc</sup>	3.50±0.84 <sup>Ab</sup>	3.00±1.26 <sup>Abc</sup>	2.17±0.75 <sup>Ac</sup>
M2	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	4.33±0.52 <sup>Aab</sup>	3.83±1.17 <sup>Abc</sup>	3.33±1.37 <sup>Abc</sup>	3.00±0.63 <sup>Ac</sup>
Genel Ürün Beğenisi General Acceptability					
	0. gün Day 0	5. gün Day 5	10. gün Day 10	15. gün Day 15	20. gün Day 20
K1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	3.67±0.82 <sup>Ab</sup>	3.67±0.82 <sup>Ab</sup>	3.83±0.75 <sup>Ab</sup>	2.67±0.52 <sup>Bc</sup>
M1	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	2.50±0.84 <sup>Bbc</sup>	3.50±1.22 <sup>Ab</sup>	3.50±1.22 <sup>Ab</sup>	1.83±0.41 <sup>Cc</sup>
M2	5.00±0.00 <sup>Aa</sup>	4.50±0.55 <sup>Aab</sup>	3.67±1.21 <sup>Abc</sup>	4.00±0.63 <sup>Abc</sup>	3.33±0.52 <sup>Ac</sup>

<sup>Aa</sup> Her bir kolonda, aynı büyük harfler uygulamalar arasında  $P \leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. Her bir satırda aynı küçük harfler her bir uygulama için depolama süresi açısından  $P \leq 0.05$  düzeyinde önemli bir farklılığın bulunmadığını göstermektedir. K1: Ambalajsız kontrol, M1: Zeolit katkısız PE, M2: Zeolit katkılı PE

<sup>Aa</sup> For each column, similar capital letters are not significantly different at  $P \leq 0.05$  among applications. For each application, similar small letters in rows are not significantly different at  $P \leq 0.05$ . K1: Unpackaged control, M1: Control PE with no zeolite, M2: PE with zeolite.

## KAYNAKLAR

- Oey I, Lille M, Van Loey A. 2008. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends Food Sci Technol.* 19(6): 320-8.
- Tavarini S, Degl'Innocenti E, Remorini D, Massai R, Guidi L. 2008. Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chem.* 107(1): 282-8.
- Karacay E, Ayhan Z. 2010. Microbial, physical, chemical and sensory qualities of minimally processed and modified atmosphere packaged "ready to eat" orange segments. *Int J Food Prop.* Aug 12; 13(5): 960-71.
- Karacay E, Ayhan Z. 2010. Physiological, physical, chemical characteristics and sensory evaluation of minimally processed grapefruit segments packaged under modified atmosphere. *J Agric Sci.* 16: 129-30.

5. Robertson GL. 2016. *Food packaging: principles and practice.* CRC press, Boca Raton, Florida, USA, 683 p.

6. Duman G. 2011. Kivi (*Actinidia deliciosa*) Meyvesinde farklı hasat sonrası uygulamalar ve farklı ambalaj tiplerinin depolama süresi ve meyve kalitesi üzerine etkileri. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale, Türkiye, 53 s.

7. Ferguson, A.R. 1999. New temperate fruits: *Actinidia chinensis* and *Actinidia deliciosa*. In: *Perspectives on new crops and new uses*, J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, Virginia, USA, pp. 342-347.

8. Yıldırım I. 2010. "Hayward" kivi çeşidinin normal ve kontrollü atmosfer koşullarında depolanması üzerine araştırmalar. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi, Antalya, Türkiye, 180 s.

9. Günay K. 2009. Ordu ekolojisinde yetiştirilen "Hayward" (*A. deliciosa Planch*) kivi çeşidinde önemli meyve kalite özelliklerinin rakım ve yöneye göre değişimi. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ordu, Türkiye, 81 s.
10. Crisosto CH, Kader AA. 1999. *Kiwifruit: postharvest quality maintenance guidelines*. Dep Pomol Univ Calif Davis, CA, USA, 9 p.
11. Arpaia ML, Mitchell FG, Mayer G. 1994. Cooling, storage, transportation and distribution. In: *Kiwifruit Growing and Handling*, Hasey JK, Johnson RS, Grant JA, Reil WO (eds.), ANR Publications, University of California, Davis, USA, pp. 108-115.
12. Hoffman NE, Yang SF. 1980. Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. *J Am Soc Hortic Sci.*, 105(4): 492-5.
13. Öz AT. 2006. Farklı zamanlarda hasat edilen kivilerde (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) normal ve kontrollü atmosfer koşullarında soğuk muhafaza süresinin etilen biyosentezine etkisi. Uludağ Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi, Bursa, Türkiye, 154 s.
14. Harman JE, McDonald B. 1989. Controlled atmosphere storage of kiwifruit. Effect on fruit quality and composition. *Sci Hortic (Amst.)*. 37(4): 303-15.
15. Antunes MDC, Sfakiotakis EM. 2002. Chilling induced ethylene biosynthesis in "Hayward" kiwifruit following storage. *Sci Hortic (Amst.)*, 92(1): 29-39.
16. Rocculi P, Romani S, Rosa MD. 2005. Effect of MAP with argon and nitrous oxide on quality maintenance of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biol Technol.* 35(3): 319-28.
17. Öz AT, Eriş A. 2009. Kontrollü atmosfer (KA) ve normal atmosfer (NA) koşullarında depolamanın farklı zamanlarda derilen "Hayward" (*Actinidia Deliciosa*) kivi çeşidinin kalite değişimine etkisi, *GIDA* 34(2): 83-89.
18. Latocha P, Krupa T, Jankowski P, Radzanowska J. 2014. Changes in postharvest physicochemical and sensory characteristics of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* and its hybrid) after cold storage under normal versus controlled atmosphere. *Postharvest Biol Technol.* 88: 21-33.
19. Küçük V. 2006. Bazı meyve ve sebzelerde raf ömrünün uzatılması için zeolitlerle birlikte paketlenmenin ürünün kalite özelliklerine etkisinin incelenmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir, Türkiye, 161 s.
20. Hu Q, Fang Y, Yang Y, Ma N, Zhao L. 2011. Effect of nanocomposite-based packaging on postharvest quality of ethylene-treated kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) during cold storage. *Food Res Int.* 44(6): 1589-96.
21. AOAC., 2005. Official Methods of Analysis. 18<sup>th</sup> Edition Arlington, Virginia, USA.
22. Mastromatteo M, Mastromatteo M, Conte A, Del Nobile MA. 2011. Combined effect of active coating and MAP to prolong the shelf life of minimally processed kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward). *Food Res Int.* 44(5): 1224-30.
23. Arpaia, ML, Mitchell, FG, Kader, AA, Mayer, G. 1985. Effects of 2% O<sub>2</sub> and varying concentrations of CO<sub>2</sub> with or without C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> on the storage performance of kiwifruit. *J Am Soc Hortic Sci.*, 110(2): 200-203.
24. Finnegan E, O'Beirne D. 2015. Characterising and tracking deterioration patterns of fresh-cut fruit using principal component analysis - Part I. *Postharvest Biol Technol.* 100: 73-80.
25. Talens P, Martinez-Navarrete N, Fito P, Chiralt A. 2002. Changes in optical and mechanical properties during osmodehydrofreezing of kiwi fruit. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 3(2): 191-9.
26. Maskan M. 2001. Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *J Food Eng.* 48(2): 169-75.
27. Ben-Arie R, Gross J, Sonogo L. 1982. Changes in ripening-parameters and pigments of the Chinese gooseberry (kiwi) during ripening and storage. *Sci Hortic (Amst.)*, 18(1): 65-70.
28. Wills, R, McGlasson, B, Graham, D, Joyce, D, Rushing, JW. 1999. Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals. *J Vegetable Crop Prod.* 4(2): 83-84.
29. Possingham JV, Coote M, Hawker JS. 1980. The plastids and pigments of fresh and dried Chinese gooseberries (*Actinidia chinensis*). *Ann Bot.* 45(5): 529-33.
30. Hewett EW, Kim HO, Lallu N. 1999. Postharvest physiology of kiwifruit: the challenges ahead. *Acta Hortic.* 498: 203-216.
31. Galeta GJ. Himelrick DG (eds.). 1990. *Small Fruit Crop Management*. 1<sup>st</sup> edition, Prentice Hall Englewood Clifts, New Jersey, USA, 602 p.

## TEKİRDAĞ'DA SATIŞA SUNULAN İHLAMUR (*TILIA SPP.*) VE KUŞBURNU (*ROSA CANINA*) ÖRNEKLERİNDE AFLATOKSİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Nuray Can, Serap Duraklı Velioglu\*

Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ

Geliş / Received: 02.09.2016; Kabul / Accepted: 17.12.2016; Online baskı / Published online: 02.03.2017

Can, N., Duraklı Velioglu, S. (2017). Tekirdağ'da satışa sunulan ıhlamur (*Tilia spp.*) ve kuşburnu (*Rosa canina*) örneklerinde aflatoksin varlığının araştırılması. *GIDA* (2017) 42 (3): 287-296 doi: 10.15237/gida.GD16087

### Öz

Bu çalışmada, Tekirdağ ili ve ilçelerindeki farklı satış noktalarından temin edilen 15 adet ıhlamur ve 15 adet kuşburnu örneğinde, aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) ve G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) varlığı HPLC yöntemi ile araştırılmıştır. Ayrıca, örneklerde nem, su aktivitesi (a<sub>w</sub>) tayini, toplam mezofilik aerobik bakteri ve toplam maya küf sayısı da yapılmıştır. Aflatoksin analizi sonucunda, ıhlamur örneklerinden birinde 0.158 µg/kg AFG<sub>1</sub> ve 0.168 µg/kg AFG<sub>2</sub>, bir diğerinde ise 0.162 µg/kg AFG<sub>2</sub> bulunmuş, örneklerdeki aflatoksin miktarlarının yasal limitlerin altında olduğu belirlenmiştir. Diğer ıhlamur ve kuşburnu örneklerinde ise, düzeyi tayin limitinin (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> için sırasıyla 0.155, 0.168, 0.156, 0.162 µg/kg) altında olmakla birlikte, incelenen aflatoksinlerden en az biri tespit edilmiştir. Bu çalışmada incelenen örneklerde düşük düzeyde de olsa aflatoksinlerin tespit edilmesi, özellikle hassas tüketici grupları tarafından bitki çayı olarak tüketilebilen ıhlamur ve kuşburnu gibi ürünlerde aflatoksinlerin bulunabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Aflatoksinler, ıhlamur, kuşburnu, mikotoksin

## DETERMINATION OF AFLATOXINS IN LINDEN (*TILIA SPP.*) and ROSEHIP (*ROSA CANINA*) SAMPLES SOLD IN TEKİRDAĞ PROVINCE

### Abstract

Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) and G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) contents of 15 linden and 15 rosehip provided from supermarkets, herbalists and bazaars in Tekirdağ province were investigated using HPLC method. Samples were also assayed for moisture, water activity (a<sub>w</sub>), total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) and total yeast and mould counts. One of the linden samples was determined to contain AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> at levels of 0.158 µg/kg and 0.168 µg/kg, respectively. AFG<sub>2</sub> content of another linden sample was determined to be 0.162 µg/kg. Aflatoxin levels of these samples were lower than the maximum permissible levels. The rest of the samples were determined to be contaminated with at least one of the four aflatoxins with levels below LOQ (0.155; 0.168; 0.156; 0.162 µg/kg for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, respectively). The existence of aflatoxins in the samples even in low levels shows that plant materials such as linden and rosehip consumed as herbal tea by sensitive consumer groups may contain aflatoxins.

**Keywords:** Aflatoxins, linden, rosehip, mycotoxin

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ svelioglu@nku.edu.tr, ☎ (+90) 282 250 2166,

☎ (+90) 282 250 9954

## GİRİŞ

Çay bitkisi (*Camellia sinensis*) dışındaki herhangi bir tıbbi veya aromatik bitkiden hazırlanan çaylar olarak tanımlanabilen bitki çayları, günümüzde sağlık üzerine faydalı etkileri sebebiyle kullanılmalarının yanı sıra, siyah çaya alternatif bir sıcak içecek olarak da sıklıkla tüketilmektedir (1, 2). Çay yapımında kullanılan bitkilerin içerdiği antioksidan aktiviteye de sahip; A, C, E vitaminleri ve fenolik bileşikler gibi birçok maddenin, hastalıkları önleme ve tedavi etmedeki rollerinin anlaşılması ile bitki çaylarına olan ilgi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (3, 4). Ülkemizde, yetişkinler tarafından tercih edildiği gibi çocuklara da içirilen bitki çaylarının başında ıhlamur ve kuşburnu gelmektedir (5-7).

Henüz yetiştirilme aşamasında dahi toprak, hava, su gibi dış etmenlere bağlı olarak mikroorganizmaların kontaminasyonuna açık olmaları ve tüketime hazır hale gelmeden önce bunları elimine etmeye yönelik çok az işlemden geçmeleri nedeniyle, çay yapımında kullanılan bitkiler, mikrobiyolojik açıdan tehlikeli hale gelebilmektedir (8-10). Atmosferde yaygın olarak bulunmalarından dolayı küfler, bitki çaylarının da aralarında yer aldığı bitkisel materyalde en sık karşılaşılan kontaminantlar arasında yer almaktadır. Bu türden bitkiler, aralarında toksijenik türlerin de yer aldığı küfleri yüksek düzeyde barındırabilmektedir (8, 11-14). Toksik küflerin varlığı mikotoksin oluşumu riskini de beraberinde getirmektedir (15).

Aflatoksinler, *Aspergillus* cinsine ait farklı türler tarafından oluşturulan ve üzerinde en çok araştırma yapılan mikotoksin grubudur. Bir kumarin halkaya bağlı dihidrofuran veya tetrahidrofuran yapıdadır (16). Günümüzde tanımlanan aflatoksin türevleri sayısının 20'nin üzerinde olduğu bilinmekle birlikte, aflatoksin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoksin B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoksin G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) ve aflatoksin G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) bu grubun en önemli toksinleri olarak görülmektedir (16-18). Gıdalarda en sık karşılaşılan aflatoksin üreticisi iki ana türden biri olan *Aspergillus flavus*, AFB<sub>1</sub> ve AFB<sub>2</sub>, *Aspergillus parasiticus* ise AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> üretebilmektedir (19, 20). Bu iki küf dünya genelinde gıdalarda bulunan aflatoksinlerden büyük oranda sorumlu tutulmaktadır (21).

Aflatoksinler, karsinojenik, teratojenik, mutajenik ve hepatotoksik etkileri nedeniyle, insan ve hayvan sağlığına yönelik ciddi tehlike oluşturmaktadır (22). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından aflatoksinler "Grup I: İnsanlar için karsinojen" olarak sınıflandırılmıştır (21). Aflatoksinlerin, kuru yemişler, kurutulmuş meyveler, tahıllar, baharatlar, yumurta, süt, peynir, yoğurt gibi ürünlerde bulunabildiği bilinmektedir (20, 23, 24). Bununla birlikte, sıklıkla tıbbi amaçlarla kullanılan ıhlamur ve kuşburnunun da aralarında yer aldığı bitki çaylarında aflatoksinler ve diğer mikotoksinlerin varlığını tespit etme amacıyla yapılmış az sayıda çalışma mevcuttur (25-28). Bu nedenle bu çalışmada, insan sağlığı üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinen aflatoksinlerin, çayı yapılarak yaygın şekilde tüketilen ıhlamur ve kuşburnundaki varlığının HPLC gibi hassas bir yöntemle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Tekirdağ ve ilçelerinde bulunan ve tesadüfi örnekleme yöntemiyle seçilen aktar, market ve semt pazarlarından oluşan 30 farklı satış noktasından, 2015 yılı Şubat ve Mart aylarında ambalajsız olarak temin edilen 15 adet ıhlamur ve 15 adet kuşburnu örneği kullanılmıştır.

### Nem tayini, su aktivitesinin belirlenmesi ve mikrobiyolojik analizler

ıhlamur ve kuşburnu örneklerinin nem değerleri etüv (Drying Oven DHG-9055A) kullanılarak 105 °C'de belirlenmiştir (29). Su aktivitesi tespiti için su aktivitesi tayin cihazı (Decagon Device, Pullman WA, ABD) kullanılmıştır (30). Her bir örnekten hazırlanan dilüsyonlardan, TMAB sayımı için Plate Count Agar (PCA, Merck) besiyerine yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapılmış ve 48 saat süre ile 28-30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (31). Maya ve küflerin sayımı amacıyla Potato Dextrose Agar (PDA, Merck) besiyeri kullanılmış ve yüzeye yayma yöntemi ile ekim yapıp, 25 °C'de 5 günlük inkübasyon gerçekleştirilmiştir (12). İnkübasyonun ardından gelişen koloniler sayılmış ve sonuçlar "koloni oluşturan birim/gram" (kob/g) olarak ifade edilmiştir.

### Aflatoksin analizi

Aflatoksin analizine ait ekstraksiyon ve saflaştırma aşamaları, R-Biopharm Firması tarafından önerilen yöntemde kısmen değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir (32-34). Ihlamur ve kuşburnu örnekleri öncelikle blenderda (Waring Commercial Laboratory Blender, ABD) öğütülmüş ve homojenize edilmiştir. Hassas terazide (Precisa, XB 220A, Precisa Gravimetrics AG, İsviçre) 50 g örnek tartılmış, üzerine 300 mL asetonitril/metanol (1:1, v:v) karışımı ve 4 g NaCl eklenerek aflatoksinler ekstrakte edilmiştir. Karışım Whatman no:4 filtre kağıdından süzölmüştür. Süzöntünün 3 mL'si pipet yardımıyla bir behere alınarak, üzerine 12 mL fosfat tamponu (PBS) eklenerek, süzöntü seyreltilmiştir. Saflaştırma aşamasında kullanılacak immunoaffinite kolon (EASI-EXTRACT® AFLATOXIN, R-Biopharm AG, Darmstadt, Almanya) öncelikle vakum manifoldu (Supelco Visiprep 57030-U, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Almanya) ve vakum pompası (Isolab GM-0.5, Interlab, Türkiye) kullanılarak 5 mL/dak. hızla 10 mL PBS geçirilerek şartlandırılmıştır. Daha sonra seyreltilmiş filtrat (0.5 g örneğe tekabül eden) 3 mL/dak. hızla, antikorlarla toksinlerin birbirine bağlanacağı EASI-EXTRACT® AFLATOXIN kolondan geçirilmiştir. Ardından 20 mL PBS, 5 mL/dak. hızla geçirilerek kolon yıkanmıştır. Aflatoksinler, kolondan saniyede 1 damla geçecek şekilde 1 mL metanol ile elue edilmiştir. Ayrıca kolondan 1 mL saf su geçirilerek aynı vialde toplanmış, elde edilen 2 mL'lik örnek, 0.45 µm 25 mm çapında PTFE Syringe filtre kullanılarak süzöldükten sonra amber renkli cam vialde alınarak HPLC'de analiz edilmiştir. Örnekler analiz edilinceye kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

HPLC ile Aflatoksin analizi, izokratik koşullarda ayrıntısı aşağıda açıklanan yöntem (33, 35) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Shimadzu HPLC sisteminde (LC-20 AT, Shimadzu, Japonya), RF-20A model floresans dedektör (Shimadzu, Japonya) 360 nm eksitasyon ve 433 nm emisyon dalga boylarına ayarlanmıştır. Çalışmada Inertsil (GL Sciences, Inc., CA, ABD) ODS-3 C18 paslanmaz çelik kolon (150 x 4.6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Su/asetonitril/metanol (6:2:3, v:v:v)'den oluşan mobil faz, litrede 350 µL, 4 M nitrik asit (HNO<sub>3</sub>), 120 mg potasyum bromür (KBr) içerecek şekilde hazırlanmış, filtre edilmiş ve ultrasonik banyoda (Wise Clean, Wisd Lab. Inst.) 10 dak. bekletilerek

gazı giderilmiştir. Akış hızı 1.0 mL/dak. olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon işleminden önce sisteme bağlı olan ve 30 dak. süreyle şartlandırılmış olan Kobra Cell (R-Biopharm Rhone Ltd., Glasgow, İskoçya) ile aflatoksinlerin türevlendirilmesi sağlanmıştır. 100 µL ekstrakt HPLC sistemine enjekte (SIL-20A oto enjeksiyon sistemi) edilerek analiz gerçekleştirilmiştir. Örneklerdeki aflatoksin konsantrasyonları, aflatoksin kalibrasyon grafikleri kullanılarak LC Solutions paket programı ile hesaplanmıştır.

Örneklerin analizi öncesinde, aflatoksin standardı (R-Biopharm AG, Darmstadt, Almanya) kullanılarak hazırlanan stok çözelti ile farklı konsantrasyonda aflatoksin standart çözeltileri hazırlanmıştır. Aflatoksin konsantrasyonuna karşılık, HPLC kromatogramında elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek aflatoksin kalibrasyon grafiği, LC Solutions paket programı kullanılarak oluşturulmuştur. Tespit limiti (Limit of Detection; LOD) ve tayin limiti (Limit of Quantification; LOQ), metodun standart sapma değerine dayanan hesaplama yöntemi ile hesaplanmıştır (36). Ihlamur ve kuşburnu için geri alma oranlarını belirlemek amacıyla, toplam 4 µg/kg aflatoksin içerecek şekilde çalışma çözeltisi ile kontamine edilmiş örnekler, ayrıntısı yukarıda açıklanan ekstraksiyon ve saflaştırma aşamalarından geçirilmiştir. Elde edilen süzöntüler, cam viallere alınarak HPLC'de analiz edilmiş ve geri alma oranları hesaplanmıştır.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

### Ihlamur ve kuşburnu örneklerinin nem ve su aktivitesi değerleri

Ihlamur örnekleri nem miktarları ortalaması %10.97 olarak bulunmuş ve nem değerlerinin %8.69-%15.17 arasında değiştiği belirlenmiştir. Kuşburnu örneklerinin nem miktarları %7.89-%24.23 aralığında bulunmuş ve ortalama nem miktarı %14.58 olarak tespit edilmiştir. Türkben ve ark. (37) kurutulmuş kuşburnu meyvelerinde nem miktarını %20.77 olarak bulmuştur. Vidovic ve ark. (38) kuşburnu meyvelerinde nem miktarını %7.54-8.31 olarak bildirmiştir. Aradaki farklılığın, çevresel etmenler, yetiştirme koşulları, meyvelerin olgunluk düzeyi, kurutma ve depolama şartları (37) gibi faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ihlamur örneklerine ait su aktivitesi değerleri 0.57-0.61 aralığında bulunmuş



olup, ortalaması 0.58 olarak belirlenmiştir. Kuşburnu örnekleri incelendiğinde, su aktivitesi değerlerinin 0.53-0.76 aralığında olduğu tespit edilmiş ve ortalama su aktivitesi değeri 0.62 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin Dağdelen ve ark. (39) tarafından ham bitki çayı numunelerinde elde edilen sonuçlar ile Özay ve ark. (40) ve Kolb (41) tarafından ortaya konulan sonuçlara yakın olduğu anlaşılmaktadır.

### **İhlamur ve kuşburnu örneklerinin mikrobiyolojik analiz sonuçları**

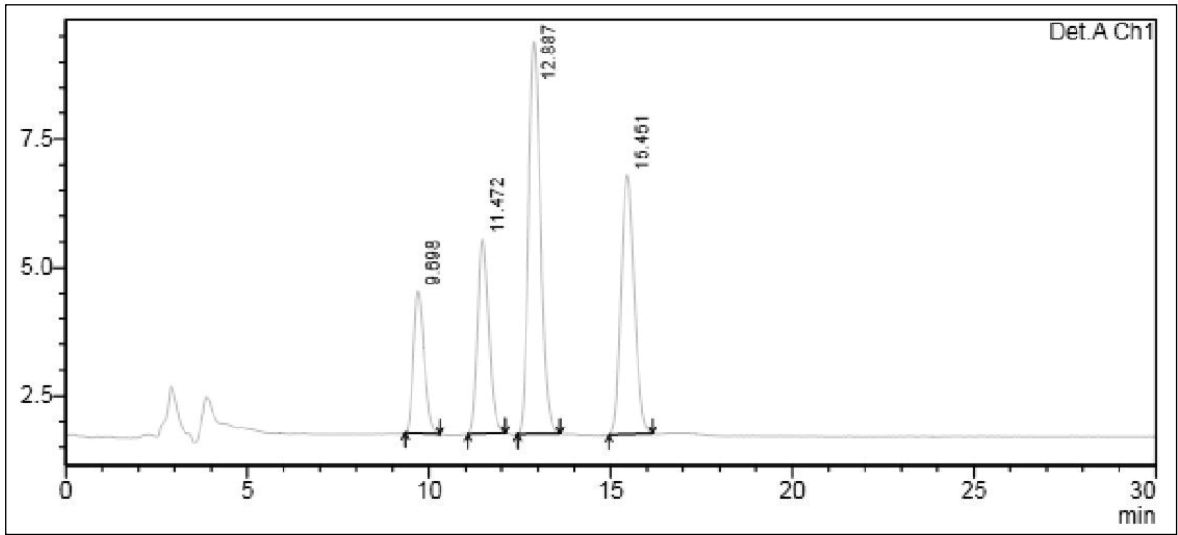
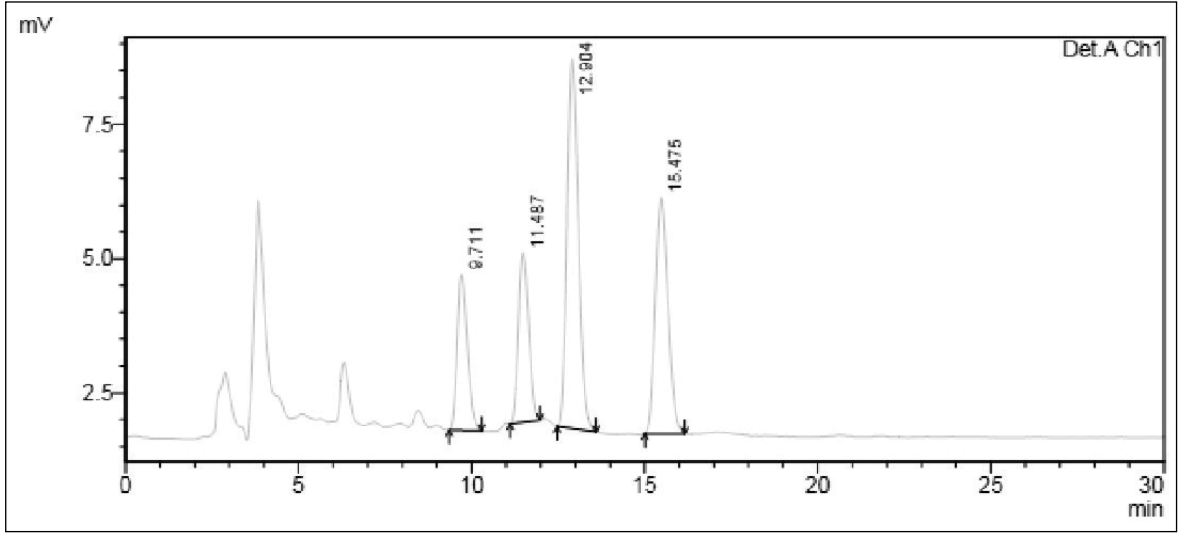
Mikrobiyolojik analizi yapılan ihlamur örneklerinde maya küf kontaminasyonunun 6 örnekte  $<1.0 \times 10^3$  kob/g, diğer örneklerde ise  $3.0 \times 10^3$ - $1.2 \times 10^5$  kob/g aralığında olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, önceki çalışmalarda ihlamurda  $10^2$ - $10^5$  kob/g maya küf tespit eden araştırmacıların ortaya koyduğu sonuçlar ile örtüşmektedir (26, 28, 41). Kuşburnu örnekleri incelendiğinde maya küf düzeyleri  $<1.0 \times 10^3$ - $3.6 \times 10^5$  kob/g olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kuşburnu örneklerinde tespit edilen maya küf düzeyi, Kaya (42) ( $<1.0 \times 10^2$  kob/g) ve Arslan (28) ( $<1.0 \times 10^1$ - $2.1 \times 10^1$  kob/g) tarafından bildirilen sonuçlardan daha yüksektir. Bu durumun, bahsi geçen çalışmalarda incelenen örneklerin ambalajlı olarak temin edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İncelenen ihlamur örneklerinde TMAB sayısının 2 örnekte  $1.0 \times 10^3$  kob/g'dan az olduğu, geriye kalan 13 örnekte ise  $3.9 \times 10^4$ - $4.3 \times 10^6$  kob/g arasında olduğu saptanmıştır. Bu değerler, Kolb (41) ve Kaya (42) tarafından yapılan çalışmalarda ihlamurda belirlenen TMAB bulgularına ( $9.8 \times 10^6$  kob/g ve  $<10^3$ - $10^9$  kob/g düzeyinde) yakınlık göstermektedir. Ancak çalışmada tespit edilen bu değerlerin, Scolari ve ark. (31) tarafından ortaya konulan ortalama  $4.0 \times 10^3$  kob/g sonucundan ise yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Kuşburnu örneklerinde TMAB düzeyinin, 7 örnekte  $1.0 \times 10^3$  kob/g'dan az olduğu, diğer örneklerde ise  $6.4 \times 10^4$  kob/g'a ulaştığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, kuşburnunda  $2.7 \times 10^3$  kob/g TMAB tespit eden Kaya (42) tarafından ortaya konulan bulgular ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışma sonucu, ihlamur ve kuşburnu örneklerinde belirlenen maya küf ve TMAB düzeyinin, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'ne ve THIE (Tea and Herbal Infusions Europe) tarafından yapılan düzenlemelere uygun olduğu anlaşılmaktadır (43, 44).

### **İhlamur ve kuşburnu örneklerinin Aflatoksinler açısından değerlendirilmesi**

Örneklerdeki aflatoksin konsantrasyonlarına ilişkin hesaplamalar, aflatoksin kalibrasyon grafikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub>'nin kalibrasyon grafiklerine ait R<sup>2</sup> değerleri sırasıyla 0.998, 0.997, 0.998 ve 0.997 olarak tespit edilmiştir. Alıkonma zamanları, AFB<sub>1</sub> için 15.5, AFB<sub>2</sub> için 12.9, AFG<sub>1</sub> için 11.5 ve AFG<sub>2</sub> için 9.7 dakika olarak belirlenmiştir. AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> için hesaplanan LOD değerleri sırasıyla 0.046, 0.050, 0.047 ve 0.049, LOQ değerleri ise sırasıyla 0.155, 0.168, 0.156 ve 0.162 olarak bulunmuştur. AFG<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> ve AFB<sub>1</sub> için belirlenen geri alma oranları ise ihlamurda, sırasıyla %71.6, %90.0, %101.2, %100.6 ve kuşburnunda sırasıyla %81.2, %98.2, %108.8, %109.6 olarak hesaplanmıştır. Türk Gıda Kodeksi 2011/32 no'lu "Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği"nde, aflatoksin analizlerinde 1-10 µg/kg konsantrasyon aralığı için geri alma oranlarının %70-110 olması gerektiği bildirilmektedir (45). Bu çalışmada elde edilen geri alma oranlarının söz konusu tebliğe uygun olduğu görülmektedir. İhlamur ve kuşburnuna ait geri alma çalışması örnek kromatogramları Şekil 1'de verilmiştir.

İhlamur ve kuşburnu örneklerinde HPLC ile yapılan aflatoksin analizi sonuçları Çizelge 1'de gösterilmektedir.

Örneklerin tamamında, incelenen aflatoksinlerden en az biri tespit edilmiştir. Çalışmada incelenen ihlamur örneklerinin %47'sinde yalnızca AFG<sub>2</sub> ve kuşburnu örneklerinin %87'sinde yalnızca AFG<sub>1</sub> veya AFG<sub>2</sub> tespit edilmiştir. Bu durum, Hiscocks (46)'un bildirdiği gibi bazı *Aspergillus* türlerinin yalnızca G grubu aflatoksinleri üretmesi ile ilişkili olabilir. Yalnızca iki adet ihlamur örneğinin, LOQ değerlerinin üzerinde aflatoksin içerdiği belirlenmiştir. Bunlardan birinde 0.158 µg/kg AFG<sub>1</sub> ve 0.168 µg/kg AFG<sub>2</sub>, diğerinde ise 0.162 µg/kg AFG<sub>2</sub> bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde bitki çaylarına ilişkin bir düzenleme bulunmamaktadır. Bununla birlikte, çalışmada elde edilen değerlerin, aynı yönetmelikte yer alan kurutulmuş meyveler (aflatoksin B<sub>1</sub> için 8 µg/kg, toplam aflatoksin (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>) için 10 µg/kg) ve baharatlarda (aflatoksin B<sub>1</sub>



Şekil 1. Aflatoksinlerin geri alım çalışmasında elde edilen kromatogramlar; (a) ıhlamur, (b) kuşburnu  
Figure 1. Chromatograms obtained from the study of recovery of aflatoxins; (a) linden, (b) rosehip

için 5 µg/kg, toplam aflatoksin için 10 µg/kg) bulunabilecek maksimum aflatoksin limitlerinin altında olduğu ifade edilebilir (47). Bu çalışmanın aksine, literatürde ıhlamur ve kuşburnunda aflatoksinlerin yüksek miktarlarda belirlendiğini bildiren çalışmalar da vardır. Ülkemizde organik bitkisel ürünlerin incelendiği bir çalışmada, ELISA yöntemi kullanılarak analiz edilen 5 ıhlamur örneğinin 2'sinde AFB<sub>1</sub> tespit edilmemiş, diğer 3 örnekte ise 0.051, 1.329 ve 40.647 µg/kg düzeylerinde AFB<sub>1</sub> belirlendiği bildirilmiştir (28).

Arslan (28) tarafından yapılan bu çalışmada, incelenen 6 adet kuşburnu örneğinin 4 tanesinde AFB<sub>1</sub> saptandığı ve miktarların 20.695-52.500 µg/kg aralığında olduğu bildirilmiştir. Ayrıca incelenen 4 adet kuşburnu ve 1 adet ıhlamur örneğinde saptanan AFB<sub>1</sub> miktarının yasal limitleri aştığı bildirilmiştir. Rizzo ve ark. (48) tarafından yapılan çalışmada da, incelenen ıhlamur örneklerinde AFB<sub>1</sub> ve AFB<sub>2</sub> tespit edildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte ıhlamur ve kuşburnunda aflatoksin tespit edilmediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur

Çizelge 1. Ihlamur ve kuşburnu örneklerine ait AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> değerleri  
Table 1. AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> values in linden and rosehip samples

Örnek No Sample Number	Örnek Türü Sample Type	Örneğin Alındığı Yer Place of Sampling	AFB <sub>1</sub> (µg/kg) <sup>a</sup>	AFB <sub>2</sub> (µg/kg) <sup>a</sup>	AFG <sub>1</sub> (µg/kg) <sup>a</sup>	AFG <sub>2</sub> (µg/kg) <sup>a</sup>
1	Ihlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
2	Ihlamur	Market	>LOD <sup>b</sup>	>LOD <sup>c</sup>	TE	>LOD <sup>e</sup>
3	Ihlamur	Aktar	>LOD <sup>b</sup>	TE	>LOD <sup>d</sup>	>LOD <sup>e</sup>
4	Ihlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
5	Ihlamur	Aktar	>LOD <sup>b</sup>	>LOD <sup>c</sup>	0.158	0.168
6	Ihlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
7	Ihlamur	Pazar	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
8	Ihlamur	Pazar	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
9	Ihlamur	Market	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
10	Ihlamur	Pazar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	>LOD <sup>e</sup>
11	Ihlamur	Market	TE	>LOD <sup>c</sup>	>LOD <sup>d</sup>	>LOD <sup>e</sup>
12	Ihlamur	Pazar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	>LOD <sup>e</sup>
13	Ihlamur	Aktar	>LOD <sup>b</sup>	TE	TE	0.162
14	Ihlamur	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	>LOD <sup>e</sup>
15	Ihlamur	Aktar	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
1	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	TE	>LOD <sup>e</sup>
2	Kuşburnu	Market	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
3	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
4	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
5	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
6	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
7	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
8	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
9	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
10	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
11	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
12	Kuşburnu	Pazar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
13	Kuşburnu	Aktar	TE	>LOD <sup>c</sup>	>LOD <sup>d</sup>	TE
14	Kuşburnu	Aktar	TE	TE	>LOD <sup>d</sup>	TE
15	Kuşburnu	Aktar	TE	>LOD <sup>c</sup>	>LOD <sup>d</sup>	TE

TE, tespit edilemedi; miktar LOD değerinden küçük

<sup>a</sup> Sonuçlar, iki paralel analiz sonucunun ortalamasını ifade etmektedir.

<sup>b</sup> Miktar LOD (0.046) değerinden büyük, LOQ (0.155) değerinden küçük

<sup>c</sup> Miktar LOD (0.050) değerinden büyük, LOQ (0.168) değerinden küçük

<sup>d</sup> Miktar LOD (0.047) değerinden büyük, LOQ (0.156) değerinden küçük

<sup>e</sup> Miktar LOD (0.049) değerinden büyük, LOQ (0.162) değerinden küçük

TE, not detected; quantity less than LOD

<sup>a</sup> The results indicate the average of two parallel analysis results.

<sup>b</sup> Quantity greater than LOD (0.046) and less than LOQ (0.155)

<sup>c</sup> Quantity greater than LOD (0.050) and less than LOQ (0.168)

<sup>d</sup> Quantity greater than LOD (0.047) and less than LOQ (0.156)

<sup>e</sup> Quantity greater than LOD (0.049) and less than LOQ (0.162)

(25, 33, 39, 49). Halt (25), bitki çaylarında mikotoksijenik küf ve mikotoksin varlığını incelemek üzere gerçekleştirdiği çalışmasında, TLC ile analiz ettiği 2 adet ihlamur örneğinde AFB<sub>1</sub> tespit etmediğini rapor etmiştir. Mısır'da, ihlamurun da aralarında bulunduğu bazı tıbbi bitkilerde yapılan bir çalışmada (49), 2'si ambalajlı olmak üzere 4 adet ihlamur örneğinde aflatoksin bulunmadığı bildirilmiştir. Romagnoli ve ark.

(33), kuşburnunun da aralarında yer aldığı tıbbi bitki ve bitki çayları ile bazı baharatların aflatoksin düzeylerini HPLC ile incelemiş ve kuşburnu örneklerinde AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> ve AFG<sub>2</sub> tespit etmediklerini bildirmiştir. Ülkemizde Dağdelen ve ark. (39) tarafından yapılan bir çalışmada da ihlamur ve kuşburnu örneklerinde AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> varlığı araştırılmış, raf ömürleri boyunca belirli aralıklarla HPLC ile analiz edilen örneklerde aflatoksin saptanmadığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada incelenen örneklerde düşük düzeyde de olsa aflatoksin tespit edilmesinin nedeni, bu örneklerde gelişen toksijenik küflerin bir miktar toksin üretmiş olması, fakat kurutma ile toksin üretimi için gerekli koşulların ortadan kaldırılması ile toksin üretiminin durması olabilir. İhlamur örneklerinde 0.57-0.61 aralığında, kuşburnu örneklerinde ise 0.53-0.76 aralığında olduğu tespit edilen  $a_w$  değerlerinin, *Aspergillus* cinsine ait küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi için gerekli minimum  $a_w$  değerlerinin altında olması da bu durumu açıklamaktadır. Çünkü *Aspergillus flavus*'un gelişebileceği minimum  $a_w$  değerinin 0.78-0.82, *A. parasiticus*'un ise 0.78-0.84 aralığında olduğu bildirilmektedir. Aflatoksin üretimi için gerekli minimum  $a_w$  değerleri (*Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* için sırasıyla 0.83-0.87 ve 0.87) ise biraz daha yüksektir (50, 51). Ayrıca, çalışmada incelenen ihlamur ve kuşburnu örneklerinin depolanmaları sırasında da toksin üretimine elverişli koşulların oluşmamış olduğu düşünülebilir. Diğer taraftan ihlamur ve kuşburnunun çeşitli kısımlarının, bazı mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyel etkisi bulunduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda çoğunlukla bazı bakteriler üzerine yoğunlaşmış olup, bakteriler üzerindeki etkinin funguslar üzerindeki etkiden daha güçlü olduğu ortaya konmuştur (52-57). Bununla birlikte, bu bitkilerin aflatoksijenik küflerin gelişmesi veya toksin oluşturması üzerinde benzer etkileri olup olmadığına ilişkin yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Dünya çapında artan kullanımları ve büyüyen küresel tıbbi bitkiler pazarındaki yerleri dikkate alındığında, bitki çaylarının güvenilirliğinin ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmaktadır. Bitki çaylarının, toksijenik küfler ile kontamine olabileceği ve küflerin, uygun şartlarda gelişerek insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunan mikotoksinleri oluşturabileceği bilinmelidir. Isıya dayanıklı olmaları nedeniyle aflatoksinlerin, bitki çaylarının hazırlanması sırasında kullanılan kaynatma ve/veya demleme gibi işlemler ile parçalanmaması ve dolayısıyla kontamine bitki çaylarının tüketilmesi sonucu organizmaya alınabilmesi de söz konusu olabilir. Bebek, çocuk ve yaşlıların yanı sıra hastalar tarafından da sıklıkla tüketilen, çoğu zaman da sağlığı korumak ve çeşitli rahatsızlıkları gidermek amacıyla tercih edilen bitki çaylarının, mikotoksinlerle, özellikle

de aflatoksinler ile bulaşabilme olasılığı, halk sağlığı açısından önemlidir. Bu tehlikeyi ortadan kaldırmaya yönelik olarak öncelikle yapılması gereken, bitki çaylarında üretimin her aşamasını kontrol altında tutmak ve iyi üretim uygulamaları ile iyi hijyen uygulamalarına bağlı kalmaktır. Bitki çaylarında toksijenik küflerin gelişiminin ve aflatoksin üretiminin önlenmesinde, özellikle kurutma ve depolama koşullarının önemi yadsınamayacağından, bu aşamalara gereken hassasiyetin gösterilmesi gerekmektedir.

### TEŞEKKÜR

Birinci yazarın yüksek lisans tezi olan bu çalışmayı, NKUBAP.00.24.YL.14.18 numaralı proje ile destekleyen NKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

1. Sezik E. 2011. Bitkilerin Dünyası: Dostlar. Klinik Toksikoloji Derneği 16. Kongresi, 18-21 Mayıs, Kayseri, Türkiye, 28.
2. Zegarac JP, Samec D, Piljac A. 2013. Herbal Teas: A Focus on Antioxidant Properties. In: *Tea in Health and Disease Prevention*, Preedy VR. (ed), Academic Press, UK, pp. 129-140.
3. Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Yankova T. 2005. Polyphenols and Antioxidant Capacity of Bulgarian Medicinal Plants. *J Ethnopharmacol*, 96: 145-150.
4. Tschiggerl C, Bucar F. 2012. The Volatile Fraction of Herbal Teas. *Phytochem Rev*, 11: 245-254.
5. Polat R, Selvi S, Çakılcıoğlu U, Açar M. 2012. Bingöl Semt Pazarlarında Satılan Yabancı Bitkilerin Etnobotanik Açısından İncelenmesi. *Bio Divers Conserv*, 5 (3): 155-161.
6. Fidan MS, Öz A, Adanur H, Turan B. 2013. Gümüşhane Yöresinde Yetişen Bazı Önemli Odun Dışı Orman Ürünleri ve Kullanım Miktarları. *Gümüşhane Univ J Sci Tech Inst*, 3 (2): 40-48.
7. Ulusoy A, Şeker M. 2013. Türkiye'de Değişen Çay Tüketim Alışkanlıkları Projesi. Trabzon Ticaret Borsası, Türkiye, 64 s.
8. Martins HM, Martins ML, Dias MI, Bernardo F. 2001. Evaluation of Microbiological Quality of Medicinal Plants Used in Natural Infusions. *Int J Food Microbiol*, 68: 149-153.

9. Vitullo M, Ripabelli G, Fanelli I, Tamburro M, Delfine S, Sammarco ML. 2011. Microbiological and Toxicological Quality of Dried Herbs. *Lett Appl Microbiol*, 52: 573-580.
10. Araújo MGF, Bauab TM. 2012. Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. *Latest Research into Quality Control*, Akyar I (ed), InTech, pp. 67-81.
11. Özyaral O, Tarkan Ö, Çevikbaş A, Johansson CB. 1994. Farmasötik Önemi Olan Bazı Droglarda Mikolojik Analizler. *Mikrobiyol Bul*, 28: 359-365.
12. Tournas VH, Katsoudas EJ. 2008. Microbiological Quality of Various Medicinal Herbal Teas and Coffee Substitutes. *Microbiol Insights*, 1: 47-55.
13. Stevic T, Pavlovic S, Stankovic S, Savikin S. 2012. Pathogenic Microorganisms of Medicinal Herbal Drugs. *Arch Biol Sci*, 64 (1): 49-58.
14. Omogbai BA, Ikenebomeh M. 2013. Microbiological Characteristics and Phytochemical Screening of Some Herbal Teas in Nigeria. *Eur Sci J*, 9 (18): 149-160.
15. Kosalec I, Cvek J, Tomic S. 2009. Contaminants of Medicinal Herbs and Herbal Products. *Arch Ind Hyg Toxicol*, 60: 485-501.
16. Hussein HS, Brasel JM. 2001. Toxicity, Metabolism, and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *Toxicology*, 167: 101-134.
17. Oruç HH. 2005. Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 24 (1-2-3-4): 105-110.
18. Yentür G, Er B. 2012. Gıdalarda Aflatoksin Varlığının Değerlendirilmesi. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 69 (1): 41-52.
19. Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M. 1999. Toxic Effects of Mycotoxins in Humans. *Bulletin*, 77 (9): 754-766.
20. Heperkan D. 2006. Detecting and Controlling Mycotoxin Contamination of Herbs and Spices. *Handbook of Herb and Spices*, Peter KV (ed), Volume 3, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 3-40.
21. IARC. 2002. Aflatoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82-7A.pdf> (Accessed 10 January 2016).
22. Daradimos E, Marcaki P, Michael K. 2000. Evaluation and Validation of Two Fluorometric HPLC Methods for the Determination of Aflatoxin B1 in Olive Oil. *Food Addit Contam*, 17 (1): 65-73.
23. Wilson DM, Mubatanhema W, Jurjevic Z. 2002. Biology and Ecology of Mycotoxigenic Aspergillus Species as Related to Economic and Health Concerns. *Mycotoxins and Food Safety*, DeVries JV, Trucksess MW, Jackson LS (ed), Volume 504, Springer Science, New York, USA, pp. 3-17.
24. Ashiq S, Hussain M, Ahmad B. 2014. Natural Occurrence of Mycotoxins in Medicinal Plants: A review. *Fungal Genet Biol*, 66: 1-10.
25. Halt M. 1998. Moulds and Mycotoxins in Herb Tea and Medicinal Plants. *Eur J Epidemiol*, 14: 269-274.
26. Martins ML, Martins HM, Bernardo F. 2001. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Black Tea and Medicinal Plants. *J Food Prot*, 64: 1268-1270.
27. Santos L, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. 2009. Screening of Mycotoxin Multicontamination in Medicinal and Aromatic Herbs Sampled in Spain. *J Sci Food Agric*, 89: 1802-1807.
28. Arslan R. 2013. Türkiye'de Üretilen Bazı Organik Baharat ve Bitkisel Çayların Aflatoksin B<sub>1</sub> Düzeyleri ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması. Celal Bayar Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Manisa, Türkiye, 126 s.
29. Cemeroglu B (ed). 2010. *Gıda Analizleri*, Genişletilmiş 2. Baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:34, Ankara, Türkiye, 657 s.
30. AOAC. 2000. Official Method 987.18, 42:1, Washington DC, USA.
31. Scolari G, Zacconi C, Vescovo M. 2001. Microbial Contamination of Tea and Aromatic Herb-Tea Products. *Ital J Food Sci*, 4 (13): 429-433.
32. Anon 2016. Mycotoxin Technical Manual. R- Biopharm Rhone. [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com) (Accessed 03 April 2016).
33. Romagnoli B, Menna V, Gruppioni N, Bergamini C. 2007. Aflatoxins in Spices, Aromatic Herbs, Herb-Teas and Medicinal Plants Marketed in Italy. *Food Control*, 18: 697-701.

34. Tekiner N, Türkyılmaz K. 2011. Türk Çaylarında Aflatoksin Varlığı ve Muhtemel Bulaşma Kaynakları. Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü Atatürk Çay ve Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Rize, Türkiye.
35. Stroka J, Anklam E, Jörissen U, Gilbert J. 2000. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study. *J AOAC Int*, 2: 320-340.
36. Vial J, Jardy A. 1999. Experimental Comparison of the Different Approaches to Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. *Anal Chem*, 71: 2672-2677.
37. Türkben C, Uylaşer V, İncedayı B, Çelikkol I. 2010. Effects of Different Maturity Periods and Processes on Nutritional Components of Rosehip (*Rosa canina* L.). *J Food Agric Environ*, 8 (1): 26-30.
38. Vidovic S, Cvetkovic D, Ramic M, Dunjic M, Malbasa R, Tepic A, Sumic Z, Velicanski A, Jokic S. 2013. Screening of Changes in Content of Health Benefit Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Status of Medicinal Plants during the Production of Herbal Filter Tea. *Ind Crop Prod*, 50: 338-345.
39. Dağdelen AF, Aşyemez AÜ, Tokat İE, Cumbul D, Dağdelen A. 2014. Mikrobiyolojik ve Aflatoksin Yönünden Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve Çaylarının İncelenmesi. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, 23-25 Eylül, Yalova, Türkiye, 191-196.
40. Özay G, Pala M, Saygı B. 1993. Bazı Gıdaların Su Aktivitesi ( $a_w$ ) Yönünden İncelenmesi. *GIDA*, 18 (6): 377-383.
41. Kolb N. 1999. Microbiological Status of Untreated Herbal Materials. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 95 (7): 263-268.
42. Kaya DB. 2006. Piyasada Satışa Sunulan Bazı Bitkisel Çayların Mikrobiyolojik Kalitesi. Ankara Üni. Fen Bil. Enst. Gıda Müh. ABD. Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 43 s.
43. Anon 2011a. Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete (3. Mükerrer), Ankara.
44. THIE. 2015. THIE's Recommended Microbiological Specification for Trade in Herbal Infusions Raw Materials (Dry). [http://www.thie-online.eu/fileadmin/inhalte/Publications/HFI/4\\_2015-06-30\\_THIE\\_Recommended\\_microbiological\\_specifications.pdf](http://www.thie-online.eu/fileadmin/inhalte/Publications/HFI/4_2015-06-30_THIE_Recommended_microbiological_specifications.pdf) (Accessed 03 April 2016)
45. Anon 2011b. Türk Gıda Kodeksi. Gıdalardaki Mikotoksin Limitlerinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (2011/32). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 15 Ağustos 2011 tarih ve 28026 sayılı Resmi Gazete, Ankara.
46. Hiscocks ES. 1965. The Importance of Molds in the Deterioration of Tropical Foods and Feedstuffs. In: *Mycotoxins in Foodstuffs*, Wogan GN (ed). MIT Press, Cambridge, MA, pp.15-26.
47. Anon 2011c. Türk Gıda Kodeksi. Bulaşanlar Yönetmeliği, Gıdalardaki Bulaşanların Maksimum Limitleri. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmi Gazete (3. Mükerrer), Ankara.
48. Rizzo I, Varsavsky E, Vedoya G, Haidukowski M, Frade H, Chiale C. 1998. Fungal and Aflatoxin Contamination of Medicinal Herbs. *Mycotoxin Res*, 14: 46-53.
49. Abou-Arab AAK, Kawther MS, El Tantawy ME, Badeaa RI, Khayria N. 1999. Quantity Estimation of Some Contaminants in Commonly Used Medicinal Plants in the Egyptian Market. *Food Chem*, 67: 357-363.
50. Sweeney MJ, Dobson ADW. 1998. Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species. *Int J Food Microbiol* 43: 141-158.
51. Tunail N. 2000. Funguslar ve Mikotoksinler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, 2. baskı; Ankara Üniversitesi. Ziraat Fak. Gıda Müh. Böl. Yayını, Ankara, 3. bölüm, 13. kısım.
52. Omar S, Lemonnier B, Jones N, Ficker C, Smith ML, Neema C, Towers GHN, Goel K, Arnason JT. 2000. Antimicrobial Activity of Extracts of Eastern North American Hardwood Trees and Relation to Traditional Medicine. *J Ethnopharmacol*, 73: 161-170.
53. Fitsiou I, Tzakou O. 2007. Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Tilia tomentosa* Moench and *Tilia cordata* Miller Oils. *J Essent Oil Res*, 19: 183-185.

54. Olech M, Nowak R, Los R, Rzymowska J, Malm A, Chrusciel K. 2012. Biological Activity and Composition of Teas and Tinctures Prepared from *Rosa rugosa* Thunb. *Cent Eur J Biol*, 7 (1): 172-182.
55. Özbucak TB, Akçin ÖE, Ertürk Ö. 2013. The Change in Ecological, Anatomical and Antimicrobiological Properties of the Medicinal Plant *Tilia Rubra* Dc. Subsp. *Caucasica* (Rupr.) V. Engler Along an Elevational Gradient. *Pak J Bot*, 45 (5): 1735-1742.
56. Kacániová M, Petrová J, Kántor A, Terentjeva M, Kluz M. 2015. *In vitro* Antimicrobial Activity of Four Slovak Medicinal Plants against Different Strains of Bacteria. *Sci Pap Anim Sci Biotechnol*, 48 (1): 137-142.
57. Rovná K, Petrová J, Terentjeva M, Cerná J, Kacániová M. 2015. Antimicrobial Activity of *Rosa canina* Flowers Against Selected Microorganisms. *J Microbiol Biotech Food Sci*, 4 (1): 62-64.



## **PÜSKÜRTMELİ KURUTMA İŞLEMİNİN MEYVE SUYU KONSANTRELERİNİN FENOLİK MADDE İÇERİĞİNE VE ANTIOKSIDAN AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

**Aslı Can Karaça\*, Hakan Başkaya, Önder Güzel, M. Mehmet Ak**

AROMSA A.Ş. Gebze Organize Sanayi Bölgesi, Gebze, Kocaeli

Geliş / Received: 11.08.2016; Kabul / Accepted: 29.01.2017; Online baskı / Published online: 15.02.2017

Karaça, A. C., Başkaya, H., Güzel, Ö., M. Mehmet Ak, M. M. (2017). Püskürtmeli kurutma işleminin meyve suyu konsantrelerinin fenolik madde içeriğine ve antioksidan aktivitesine etkisi. *GIDA* (2017) 42 (3): 297-304 doi: 10.15237/gida.GD16085

### **Öz**

Bu çalışmada dokuz çeşit meyve suyu konsantresi püskürtmeli kurutma (PK) tekniği ile toz haline dönüştürülerek işlemin toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ahududu, armut, böğürtlen, çilek, elma, kayısı, kırmızı yaban mersini, portakal ve vişne suyu konsantrelerinin toplam fenolik madde (TFM) içeriği ve DPPH ile ABTS radikallerini yakalama aktivitesi kurutma öncesi ve sonrası ölçülmüştür. Vişne, çilek ve kırmızı yaban mersini tozları yüksek TFM içeriğine (19.2–30.1 mg GAE/g meyve k.m.) sahipken; armut ve elma tozlarının TFM içeriği ise düşük (3.3-4.7 mg GAE/g meyve k.m.) bulunmuştur. Uygulanan deneysel koşullar altında PK işlemi, meyve konsantrelerinin TFM içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe yol açmamıştır. Meyve tozlarının DPPH radikalini yakalama aktivitesi 9.2 ila 25.0 mg TE/g meyve k.m. arasında değişirken; ABTS radikalini yakalama aktivitesi ise 5.1 ila 18.4 mg TE/g meyve k.m. arasında değişmiştir. Genel olarak vişne, çilek ve kırmızı yaban mersini tozları yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Meyve suyu konsantreleri de TFM içeriği ve antioksidan aktivite açısından meyve tozlarına benzer eğilimler göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Püskürtmeli kurutma, meyve suyu konsantresi, toplam fenolik madde içeriği, antioksidan aktivite.

## **EFFECT OF SPRAY DRYING ON PHENOLIC CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FRUIT JUICE CONCENTRATES**

### **Abstract**

The objective of this study was to investigate the effect of spray drying on total phenolic content (TPC) and DPPH and ABTS radical scavenging activities of apple, apricot, blackberry, cranberry, orange, pear, raspberry, sour cherry and strawberry juice concentrates. Spray drying was not found to result in statistically significant changes in TPC and antioxidant activity of the concentrates under the experimental conditions applied in this study. Sour cherry, strawberry and cranberry powders had high TPC (19.2–30.1 mg GAE/g fruit d.m.) whereas pear powder had the lowest TPC followed by apple powder (3.3 and 4.7 mg GAE/g fruit d.m., respectively). DPPH radical scavenging activity of fruit powders changed between 9.2 and 25.0 mg TE/g fruit d.m. while their ABTS radical scavenging activity ranged between 5.1 and 18.4 mg TE/g fruit d.m. Sour cherry, strawberry and cranberry powders showed high antioxidant activity. Similar trends for TPC and antioxidant activity were also observed in the corresponding fruit concentrates.

**Keywords:** Spray drying, fruit juice concentrate, total phenolic content, antioxidant activity.

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ asli.cankaraca@aromsa.com.tr, © (+90) 262 326 1111, ☎ (+90) 262 751 1390

## GİRİŞ

Meyve suyu konsantrelerinin toz hale dönüştürülmesi, uzun ticari raf ömrü, ambalaj ve taşıma avantajları ve daha önemlisi toz içecek ve puding karışımı gibi ürünlerde kullanım olanağı sağlamaktadır. Sıkça kullanılan kurutma teknikleri arasında güneş enerjisi ile kurutma, tepsili kurutma, akışkan yatakta kurutma, püskürtmeli kurutma (PK), osmotik kurutma, dondurarak kurutma ve mikrodalga kurutma yer almaktadır. Meyve suyu konsantrelerini kurutmak için uygun tekniklerin başında PK gelmektedir zira elde edilen toz ürünü ilave bir işleme (örn., öğütme) gerek olmadan kullanmak mümkün olmaktadır. Püskürtmeli kurutmaya diğer tekniklerden ayıran önemli bir üstünlüğü ise işlem süresinin kısa olmasıdır. PK işleminde kurutulacak bulamaç (i.e., sulu çözelti, emülsiyon veya süspansiyon), bir atomizer vasıtasıyla sıcak hava ortamına damlacıklar halinde püskürtülür. Sıvının atomizasyonu, sıcak hava ile suyun uzaklaştırılması ve katı partiküllerin siklonda havadan ayrılması PK işleminin genel hatlarını oluşturmaktadır (1, 2). Damlacıkların çok küçük, dolayısıyla kurutma yüzeyinin çok büyük olması tüm sürecin saniyeler mertebesinde tamamlanmasına imkan vermektedir. Bu özelliği sayesinde PK işleminde, ürünün kalite özelliklerini önemli ölçüde korumak mümkün olmaktadır (3, 4). Ayrıca, PK işleminde ürün kalitesine genel olarak olumlu katkı yapan maltodekstrin, akasya gamı, modifiye nişasta, modifiye selüloz gibi çeşitli taşıyıcı malzemeler kullanılmaktadır (5).

Meyve ve sebzeler, fenolik maddeler, mineraller ve vitaminler gibi insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan bileşikler içerdiklerinden bazen fonksiyonel gıda olarak da nitelendirilmektedir (6-8). Meyve-sebze tüketiminin kalp hastalıkları, solunum yolu rahatsızlıkları, çeşitli kanser türleri ve diyabete yakalanma riskini azaltmada yardımcı olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmaktadır (9-12). Ülkemiz, coğrafi konumu, geniş tarımsal arazisi, toprak özellikleri ve iklim koşulları nedeniyle birçok tarımsal ürünün yetiştirilmesine imkan vermektedir (13, 14). Türkiye, meyve çeşidi yönünden oldukça zengindir ve birçok meyvenin üretiminde dünya ölçeğinde üst sıralarda yer almaktadır (15). Ülkemizde yetiştirilen meyvelerin önemli bir kısmı taze olarak tüketilmekte, bir kısmı dondurularak satılmakta, bir bölümü ise reçel,

marmelat, meyve suyu, konsantre ve püre gibi ürünlere işlenmektedir.

Konsantre, pulp, püre veya ekstrakt gibi farklı meyve ürünlerinin PK işlemi ile kurutulmasında proses parametrelerinin ve bulamaç kompozisyonunun optimize edilmesi çeşitli araştırmacılarca incelenmiştir (16-26). PK işlemi ile elde edilen meyve tozlarında nem içeriği, su aktivitesi, camısı geçiş sıcaklığı, yığın yoğunluğu, yığın açısı, ıslanabilirlik ve boyut gibi özellikler ölçülerek ürün karakterizasyonu yapılmaktadır. Kurutma işleminin meyvenin kalite özelliklerini ne derecede etkilediğini ortaya koyabilmek için ise toplam fenolik madde (4, 27, 28, 34, 36-38), antosiyanin (18, 28-30, 34, 37), karotenoid (31, 32) ve askorbik asit (31, 36) içeriği ile antioksidan aktivitesinin (27, 29, 30, 33, 35-37) değişimi sıkça ölçülen parametreler arasındadır. Bu çalışmanın amacı, PK işleminin ahududu, armut, böğürtlen, çilek, elma, kayısı, kırmızı yaban mersini, portakal ve vişne suyu konsantrelerinin TFM içeriği, DPPH ve ABTS radikallerini yakalama aktivitesi üzerine etkisini incelemektir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada kullanılan ahududu, armut, böğürtlen, çilek, elma, kayısı, kırmızı yaban mersini, portakal ve vişne suyu konsantreleri (toplam çözünmüş madde içeriği  $65 \pm 5$ ) yerli üreticilerden temin edilmiştir. Taşıyıcı malzeme olarak maltodekstrin DE12 ve akasya gamı karışımı (3:1) kullanılmıştır. Folin-Ciocalteu reaktifi, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikali, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radikali, Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), sodyum karbonat ve gallik asit Sigma-Aldrich firmasından (Steinheim, Almanya) temin edilmiştir.

### Püskürtmeli Kurutma İşlemi

Meyve suyu konsantresi, taşıyıcı malzeme ve distile su sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak bulamaç haline getirilmiştir. Tüm numuneler için bulamacın toplam çözünmüş madde içeriği ( $40.0 \pm 1.0^\circ\text{Brix}$ ) ve sıcaklığı ( $45 \pm 3^\circ\text{C}$ ) sabit tutulmuştur. PK işlemi 1 kg/saat su buharlaştırma kapasitesine sahip laboratuvar

ölçekli PK cihazı (B-290, BÜCHI, Flawil, İsviçre) ile tüm numuneler için aynı işlem koşulları altında gerçekleştirilmiştir. PK işleminin parametreleri (150°C hava giriş sıcaklığı; %30 pompa ayarı) belirlenirken grubumuzca gerçekleştirilen; vişne suyu konsantresinin PK işlemi ile kurutulduğu çalışmanın (26) sonuçları esas alınmıştır. Elde edilen toz ürün hava almayacak şekilde ambalajlanmış ve analiz edilene dek oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### **Nem İçeriği ve Su Aktivitesi**

Meyve tozu numunelerinin nem içeriği gravimetrik yöntemle vakumlu etüvde (EV018, Nüve, Ankara, Türkiye) 70°C'de 24 saat süreyle kurutularak belirlenmiştir. Su aktivitesi ise AquaLab VSA (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, ABD) cihazı ile 25°C'de ölçülmüştür.

### **Toplam Fenolik Madde İçeriği**

Toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite ölçümleri öncesinde yaklaşık 1,5 g meyve tozu numunesi 100 mL suda çözündürülerek analize hazırlanmıştır.

Meyve suyu konsantresi ve meyve tozu numunelerinin TFM içeriği Folin-Ciocalteu metodu ile, Murugesan ve Orsat'ın çalışmasında (4) tarif edilen şekilde belirlenmiştir. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Spektrofotometre (DR5000, Hach Lange GmbH, Germany) ile 760 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Örneklerin TFM içeriği standart eğri kullanılarak belirlenip, sonuçlar miligram gallik asit eşdeğeri/gram meyve kuru maddesi (mg GAE/g meyve k.m.) şeklinde ifade edilmiştir.

### **Antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

Meyve suyu konsantresi ve meyve tozu numunelerinin antioksidan kapasitesi, DPPH ve ABTS radikallerini yakalama aktivitesi temel alınarak belirlenmiştir. DPPH radikalini yakalama aktivitesi Kumaran ve Karunakaran'ın (38) çalışmasında anlatılan şekilde belirlenmiştir. Standart olarak Trolox kullanılmıştır. Spektrofotometre'de 517 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. ABTS radikalini yakalama aktivitesi ise Miller ve Rice-Evans'ın (39) çalışmasında tarif edilen şekilde belirlenmiştir. Spektrofotometre ile 734 nm dalga boyunda

absorbans değeri ölçülmüştür. Standart olarak Trolox kullanılmıştır. Örneklerin DPPH ve ABTS radikallerini yakalama aktivitesi standart eğri kullanılarak belirlenmiş; sonuçlar miligram Trolox eşdeğeri/gram meyve kuru maddesi (mg TE/g meyve k.m.) şeklinde ifade edilmiştir.

### **İstatistiksel Analiz**

Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde rapor edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için, veriler SPSS yazılımı (sürüm 17.0, SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) ile tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Numuneler arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Duncan testi kullanılmıştır ( $P<0.05$ ).

## **SONUÇ ve TARTIŞMA**

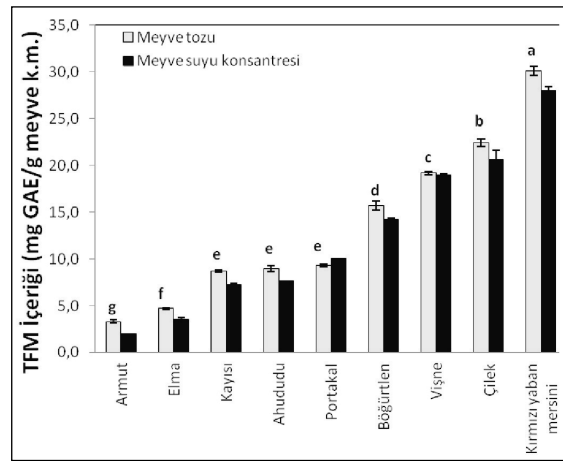
PK işlemi ile elde edilen meyve esaslı toz ürünlerde nem içeriği ve su aktivitesi kurutma işleminin performansını gösteren ve endüstriyel açıdan önem taşıyan parametrelerdir. Bu çalışmada elde edilen ürünlerin nem içeriği ve su aktivitesi sonuçları Çizelge 1'de gösterilmiştir. İncelenen meyve tozlarının nem içeriği %0.8 ila %2.5; 25°C'deki su aktivitesi ise 0.15 ila 0.29 arasında değişmektedir. Bu sonuçlar, çalışmamızın deneysel koşulları altında üretilen meyve tozlarının, genel olarak bu tip ürünler için istenen nem spesifikasyonuna (<%5) uygun olduğunu göstermektedir (26). Benzer nem içeriği (<%4) ve su aktivitesi (<0.3) değerleri PK işlemi ile elde edilmiş açai tozu (18), karadut tozu (20) ve kuru üzüm tozu (40) numuneleri için de rapor edilmiştir.

Bu çalışmada incelenen meyve konsantrlerinin TFM içeriği üzerinde PK işleminin istatistiksel açıdan önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. PK işlemi ile elde edilen meyve tozlarının TFM içeriği 3.3 ila 30.1 mg GAE/g meyve k.m. arasında değişmiştir. Şekil 1'de görüleceği üzere, böğürtlen, vişne, çilek ve kırmızı yaban mersini tozları yüksek TFM içeriğine (15.7–30.1 mg GAE/g meyve k.m.) sahipken; kayısı, ahududu ve portakal tozlarının TFM içeriği 8.7 ila 9.3 mg GAE/g meyve k.m. arasında değişmiştir. İncelenen numuneler içerisinde armut ve elma tozlarının düşük TFM içeriğine (3.3 ve 4.7 mg GAE/g meyve k.m.) sahip olduğu görülmüştür. PK yöntemi ile meyve tozu eldesi üzerine yayımlanmış araştırmaların ortaya koyduğu bir

Çizelge 1. Püskürtmeli kurutma işlemi ile elde edilen meyve tozlarının nem içeriği ve su aktivitesi1.  
Table 1. Moisture content and water activity of spray dried fruit powders.

Numune Sample	Nem içeriği Moisture content (%)	Su aktivitesi water activity
Vişne tozu Sour cherry powder	0.8±0.1	0.15±0.00
Çilek tozu Strawberry powder	2.1±0.3	0.20±0.00
Elma tozu Apple powder	2.5±0.2	0.21±0.01
Armut tozu Pear powder	1.3±0.2	0.15±0.00
Kayısı tozu Apricot powder	1.2±0.1	0.17±0.01
Ahududu tozu Raspberry powder	2.1±0.2	0.26±0.00
Portakal tozu Orange powder	1.5±0.1	0.26±0.01
Kırmızı yaban mersini tozu Red blueberry powder	1.7±0.2	0.29±0.01
Böğürtlen tozu Blackberry powder	1.7±0.1	0.23±0.00

<sup>1</sup> Veriler ortalama±standart sapma şeklinde gösterilmiştir (n = 3).  
Mean±standard deviation (n= 3)



Şekil 1. Meyve suyu konsantrelerinin ve PK işlemi ile elde edilen meyve tozlarının toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/g meyve k.m.). Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir (n = 3). Farklı harfler meyve tozu numuneleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkları temsil etmektedir (P < 0.05).

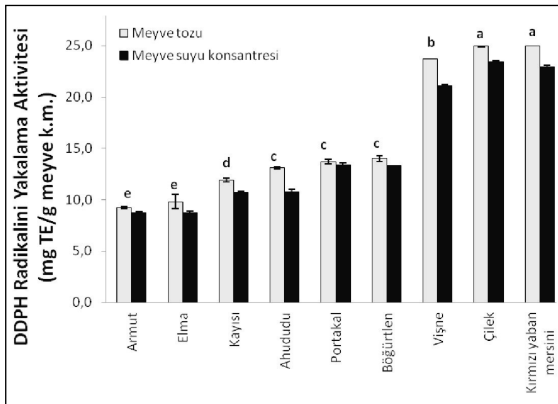
Figure 1. Total phenolic content of fruit juice concentrates and spray dried fruit powders (mg GAE/g fruit d.m.). Data represent the mean ± one standard deviation (n=3). Means in each bar followed by different letters were significantly different (P<0.05).

bulgu, işlem etkisinin kullanılan yardımcı maddelere göre değiştiğidir. Örneğin, Can Karaça ve diğerlerinin (26) vişne suyu konsantresini maltodekstrin ve akasya gamı kullanarak kuruttukları çalışmada, hava giriş sıcaklığı (130–150°C) ve bulamaç besleme hızının (%30–50 pompa ayarı) elde edilen toz ürünün TFM içeriği üzerinde etkili olmadığı; buna karşılık ürünün TFM içeriğinin kullanılan taşıyıcı malzeme türü ve meyve oranına göre değiştiği görülmüştür. Akasya gamı kullanılarak elde edilen vişne tozunun TFM içeriğinin maltodekstrin kullanılarak elde edilen vişne tozlarının TFM içeriğinden yüksek

olduğu bulunmuştur. Akkaya ve diğerlerinin (35) keçiyoynuzu pekmezini farklı dekstroz eşdeğerli (DE9, 15 ve 19) maltodekstrinler kullanarak kuruttukları çalışmada bu işlemin pekmezin TFM içeriğini olumsuz yönde etkilemediği görülmüştür. PK işleminde giriş hava sıcaklığı olarak 160–210°C gibi yüksek sıcaklıklar kullanılsa da toz ürün sıcaklığının 75°C'nin üzerine çıkmaması sebebiyle ürün kalitesinin önemli ölçüde etkilenmediği ve besin öğelerinin korunduğu bildirilmiştir. Nunes ve diğerleri (41), yerba mate (*Ilex paraguariensis*) bitkisinin ekstraktını maltodekstrin kullanarak PK işlemi ile kuruttukları çalışmada fenolik maddelerin %87.5 oranında alıkonduğunu bildirmiş ve maltodekstrinin fenolik bileşenlerin enkapsülasyonunda koruyucu etkisi vurgulanmıştır. Tonon ve diğerleri (33) açai pulpunu maltodekstrin, akasya gamı ve tapyoka nişastası gibi farklı taşıyıcı malzemeler kullanarak kurutmuş ve ürünlerin çeşitli fizikokimyasal ve morfolojik özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan açai pulpunun TFM içeriğinin PK işleminden ne ölçüde etkilendiği rapor edilmemiştir; ancak kullanılan taşıyıcı malzemenin ürünlerin TFM içeriğinde etkili olduğu görülmüştür. En yüksek TFM içeriği, akasya gamı ve maltodekstrin ile kurutulan üründe elde edilmiştir. Benzer şekilde, Murugesan ve Orsat (4) da mürver suyunu PK işlemi ile kuruttukları çalışmada, kullanılan taşıyıcı malzeme türünün elde edilen mürver tozunun TFM içeriği üzerinde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Genel olarak, akasya gamı kullanılarak elde edilen mürver tozlarının TFM içeriğinin soya proteini ve maltodekstrin gibi diğer taşıyıcı malzemelerle elde edilen numunelerin TFM içeriğinden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Diğer yandan, PK işlemi ile elde

edilen açai tozlarının TFM içeriğinin (132–142 mg GAE/g meyve k.m.), dondurarak kurutma işlemine kıyasla (149 mg GAE/g meyve k.m.) düşük olduğu belirtilmiştir (33). Horszwald ve diğerlerinin (37) aroniya suyunu farklı tekniklerle kuruttukları çalışmada ise PK işlemi ve dondurarak kurutma işlemi ile elde edilen meyve tozlarının TFM içeriğinin benzer olduğu bulunmuştur. Çeşitli kurutma tekniklerinin kalite öğeleri üzerinde farklı etkiler yapması aslında uygulanan ısıl işlemin sıcaklık-süre kombinasyonunun bir sonucudur (42).

Çalışmamızda kullanılan deneysel koşullar altında PK işleminin meyve konsantrelerinin DPPH ve ABTS radikallerini yakalama aktivitesini etkilemediği görülmüştür. PK işlemi ile elde edilen meyve tozlarının DPPH radikalini yakalama aktivitesi 9.2 ila 25.0 mg TE/g meyve k.m. arasında değişmiştir. Şekil 2'de görüleceği üzere, vişne, çilek ve kırmızı yaban mersini tozlarının DPPH radikalini yakalama aktivitesinin yüksek (>23.7 mg TE/g meyve k.m.) olduğu belirlenmiştir. Kayısı, ahududu, portakal ve böğürtlen tozlarının DPPH radikalini yakalama aktivitesi 11.9 ila 14.0 mg TE/g meyve k.m. arasında değişirken; armut ve elma tozlarının DPPH radikalini yakalama aktivitesi



Şekil 2. Meyve suyu konsantrelerinin ve PK işlemi ile elde edilen meyve tozlarının DPPH radikalini yakalama aktivitesi (mg TE/g meyve k.m.). Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde gösterilmiştir (n = 3). Farklı harfler meyve tozu numuneleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkları temsil etmektedir (P < 0.05).

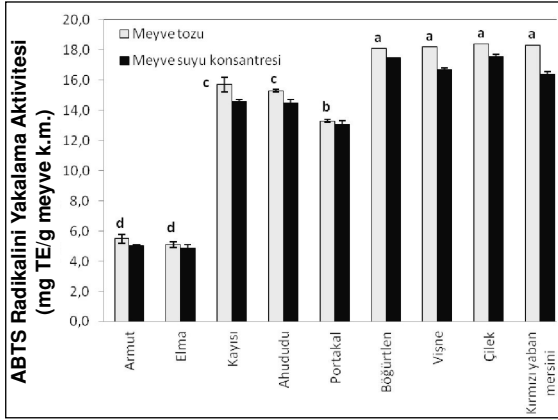
Figure 2. DPPH radical scavenging activity of fruit juice concentrates and spray dried fruit powders (mg TE/g fruit d.m.). Data represent the mean ± one standard deviation (n=3). Means in each bar followed by different letters were significantly different (P<0.05).

diğer numunelere göre düşük bulunmuştur (~9.5 mg TE/g meyve k.m.).

Meyve tozlarının ABTS radikalini yakalama aktivitesi ise 5.1 ila 18.4 mg TE/g meyve k.m. arasında değişmiştir. Şekil 3'te görüleceği üzere, böğürtlen, vişne, çilek, kırmızı yaban mersini tozlarının ABTS radikalini yakalama aktivitesinin yüksek (18.1–18.4 mg TE/g meyve k.m.) olduğu belirlenmiştir. Portakal, ahududu ve kayısı tozlarının ABTS radikalini yakalama aktivitesi 13.3 ila 15.7 mg TE/g meyve k.m. arasında değişmiştir. Armut ve elma tozları ise, diğer numunelere kıyasla düşük antioksidan aktivite (~5.3 mg TE/g meyve k.m.) göstermiştir.

Çalışmamızda meyve konsantrelerinin antioksidan aktivitesi tıpkı TFM içeriğinde olduğu gibi, PK işleminden etkilenmemiştir. Nunes ve diğerleri (41), yerba mate bitkisinin ekstraktını maltodekstrin kullanarak PK işlemi ile kuruttuklarında elde edilen tozun DPPH radikalini yakalama aktivitesinin (23.0 µg/mL) taşıyıcı malzeme kullanılmadan tek başına aynı koşullar altında kurutulan ekstraktın aktivitesinden (12.3 µg/mL) yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Akkaya ve diğerleri (35) ise keçiyoynuzu pekmezini maltodekstrin kullanarak PK işlemi ile kuruttukları çalışmada pekmezin antioksidan aktivitesinin %80 oranında korunduğunu bildirmişlerdir. Açai suyunu maltodekstrin kullanarak kurutulduğu çalışmada, antioksidan aktivitenin yaklaşık %95 oranında korunduğu bildirilmiştir (43). Öte yandan, nar suyunu maltodekstrin kullanarak kurutan Horuz ve diğerleri (29), elde edilen nar tozunun antioksidan aktivitesinin %49–77 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Buna karşın bazı numunelerin antioksidan aktivitesinin nar suyunun antioksidan aktivitesinden (%62) yüksek olduğu rapor edilmiştir (29).

Meyve tozlarının TFM içeriği ve antioksidan aktivitesi arasında güçlü bir ilişki gözlenmiştir. TFM içeriğinin DPPH ve ABTS radikallerini yakalama aktiviteleri arasındaki korelasyon katsayıları sırasıyla 0.937 ve 0.781 olarak hesaplanmıştır. Çalışmamıza benzer şekilde, Gil ve diğerleri (44) nektarin, şeftali ve erikte; Gardner ve diğerleri (45) çeşitli meyve sularında; Thaipong ve diğerleri (46) ise guava meyvesinde



Şekil 3. Meyve suyu konsantrelerinin ve PK işlemi ile elde edilen meyve tozlarının ABTS radikalini yakalama aktivitesi (mg GAE/g meyve k.m.). Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde gösterilmiştir (n = 3). Farklı harfler meyve tozu numuneleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkları temsil etmektedir (P < 0.05).

Figure 3. ABTS radical scavenging activity of fruit juice concentrates and spray dried fruit powders (mg TE/g fruit d.m.). Data represent the mean  $\pm$  one standard deviation (n=3). Means in each bar followed by different letters were significantly different (P<0.05).

TFM içeriği ile farklı radikallerle belirlenen antioksidan aktivite arasında yüksek korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir. DPPH ve ABTS radikalini yakalama aktivitesi değerleri arasındaki korelasyon katsayısı ise 0.739 olarak hesaplanmıştır. DPPH ve ABTS metotları arasında gözlenen farklar, kullanılan radikallerin çözünürlük ve stabilite farkları ve reaksiyon kinetiklerinin farklı olması ile açıklanmaktadır (47).

Sonuç olarak, çalışmamızda uygulanan koşullar altında, meyve suyu konsantrelerinin TFM içeriği ve antioksidan aktivitesi PK işleminden etkilenmemiştir. PK tekniğinde ürünün sıcak hava ile temas süresinin saniyeler düzeyinde olması antioksidan aktivitenin korunması açısından avantaj sağlamıştır. PK işleminin bu çalışmada incelenen 9 çeşit meyve suyu konsantresinin sağlık üzerinde faydalı etkileri olduğu bilinen antioksidan bileşenlerinin korunarak kurutulması için elverişli bir metot olduğu görülmüştür. Meyve tozlarının stabilitesi için kullanılan taşıyıcı malzemelerin TFM gibi kalite nitelikleri üzerinde koruyucu etki yapması endüstriyel açıdan önemli bir bulgudur. PK işleminin meyve tozlarında kalite niteliklerini koruyucu olması bu tozların gıdalarda daha yaygın kullanılmasını teşvik edecektir.

## KAYNAKLAR

1. Masters K. 1985. Spray Drying Handbook. Ch 1. Introduction. S. 1-18. *John Wiley & Sons Inc., New York.*
2. Sagar VR, Kumar SK. 2010. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: A review. *J Food Sci Technol* 47: 15-26.
3. Medeiros MFD, Souza JS, Alsina OLS, Rocha SCS. 2010. Drying of tropical fruit pulps: An alternative spouted-bed process. M. L. Passos ve C. P. Ribeiro (Ed.). In *Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products*. CRC Press, Boca Raton, s: 361-388.
4. Murugesan R, Orsat V. 2011. Spray drying of elderberry (*Sambucus nigra* L.) juice to maintain its phenolic content. *Drying Technol* 29: 1729-1740.
5. Rocha SCS, Souza JS, Alsina OLS, Medeiros MFD. 2011. Drying of tropical fruit pulps: Spouted bed process optimization as a function of pulp composition. *Drying Technol* 29: 1587-1599.
6. Yılmaz E. 2002. Turunçgil meyvelerinin insan sağlığına etkileri. *Gıda Müh Derg*, 6: 47-52.
7. Pehlivan M, Güleriyüz M. 2004. Ahududu ve böğürtlenlerin insan sağlığı açısından önemi. *Bahçe*, 33: 51-57.
8. Nizamlioğlu NM, Nas S. 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknoloji Elektronic Derg*, 5: 20-35.
9. Liu RH. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am Clin Nutr* 78: 517S-520S.
10. Lin BH. 2004. Fruit and vegetable consumption - looking ahead to 2020. *USDA Agricultural Information Bulletin* 792: 1-4.
11. Knai C, Pomerleau, J, Lock K, McKee M. 2006. Getting children to eat more fruit and vegetables: A systematic review. *Prev Med* 42: 85-95.
12. Nantz MP, Rowe CA, Nieves Jr. C, Percival SS. 2006. Immunity and antioxidant capacity in humans is enhanced by consumption of a dried, encapsulated fruit and vegetable juice concentrate. *J Nutr* 136: 2606-2610.
13. Akbay C, Candemir S, Orhan E. 2005. Türkiye'de yaş meyve ve sebze ürünleri üretim ve pazarlanması. *KSÜ Fen Müh Derg* 8: 96-107.

14. Gül M, Akpınar MG. 2006. Dünya ve Türkiye meyve üretimindeki gelişmelerin incelenmesi. *Akdeniz Üniv Ziraat Fak Derg* 19: 15-27.
15. FAO. 2016. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
16. Cano-Chauca, M, Stringheta PC, Sardagna LD, Cal-Vidal J. 2004. Mango juice dehydration spray drying using different carriers and functional characterization. Drying 2004 – Proceedings of the 14th International Drying Symposium, s: 2005-2012.
17. Chegini GR, Ghobadian B. 2007. Spray dryer parameters for fruit juice drying. *World J Agric Sci* 3: 230-236.
18. Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. 2008. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *J Food Eng* 88: 411-418.
19. Moreira GEG, Costa MGM, de Souza ACR, de Brito ES, Medeiros MFD, de Azeredo HMC. 2009. Physical properties of spray dried acerola pomace extract as affected by temperature and drying aids. *LWT - Food Sci Tech* 42: 641-645.
20. Fazaeli M, Emam-Djomeh Z, Ashtari AK, Omid M. 2012. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food Bioprod Process* 90: 667-675.
21. Vardın H, Yaşar M. 2012. Optimisation of pomegranate (*Punica Granatum* L.) juice spray-drying as affected by temperature and maltodextrin content. *Int J Food Sci Tech* 47: 167-176.
22. Zareifard MR, Niakousari M, Shokrollahi Z and Javadian SA. 2012. Feasibility study on the drying of lime juice: The relationship between the key operating parameters of a small laboratory spray dryer and product quality. *Food Bioprocess Tech* 5: 1896-1906.
23. Bakar J, Ee SC, Muhammad K, Hashim DM, Adzahan N. 2013. Spray-drying optimization for red pitaya peel (*Hylocereus polyrhizus*). *Food Bioprocess Tech* 6: 1332-1342.
24. Borrmann D, Pierucci APTR, Leite SGF, Leão MHMR. 2013. Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. *Food Bioprod Process* 91: 23-27.
25. Patil V, Chauhan AK, Singh RP. 2014. Optimization of the spray-drying process for developing guava powder using response surface methodology. *Powder Technol* 253: 230-236.
26. Can Karaca A, Guzel O, Ak MM. 2016. Effects of processing conditions and formulation on spray drying of sour cherry juice concentrate. *J Sci Food Agric* 96: 449-455.
27. Mishra P, Mishra S, Mahanta CL. 2014. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. *Food Bioprod Process* 92: 252-258.
28. Ferrari CC, Germer SPM, Alvim ID, Vissotto FZ, de Aguirr, JM. 2012. Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *Int J Food Sci Tech* 47: 1237-1245.
29. Horuz E, Altan A, Maskan M. 2012. Spray drying and process optimization of unclarified pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Dry Technol* 30: 787-798.
30. Silva PI, Stringheta PC, Teófilo RF, de Oliveira IRN. 2013. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *J Food Eng* 117: 538-544.
31. Santana AA, Kurozawa LE, de Oliveira RA, Park KJ. 2013. Influence of process conditions on the physicochemical properties of pequi powder produced by spray drying. *Dry Technol* 31: 825-836.
32. Quek SY, Chok NK, Swedlund P. 2007. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chem Eng Process* 46: 386-392.
33. Tonon RV, Brabet C, Pallet D, Brat P. Hubinger MD. 2009. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *Int J Food Sci Tech* 44: 1950-1958.
34. Yousefi S, Emam-Djomeh Z, Mousavi SM. 2011. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.). *J Food Sci Tech* 48: 677-684.



35. Akkaya Z, Schröder J, Tavman S, Kumcuoglu S, Schuchmann HP, Gaukel V. 2012. Effects of spray drying on physical properties, total phenolic content and antioxidant activity of carob molasses. *Int J Food Eng* 8: 1-13.
36. Lee KH, Wu TY, Siow LF. 2013. Spray drying of red (*Hylocereus polyrbizus*) and white (*Hylocereus undatus*) dragon fruit juices: physicochemical and antioxidant properties of the powder. *Int J Food Sci Tech* 48: 2391-2399.
37. Horszwald A, Julien H, Andlauer W. 2013. Characterisation of Aronia powders obtained by different drying processes. *Food Chem* 141: 2858-2863.
38. Kumaran A, Karunakaran RJ. 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem* 97: 109-114.
39. Miller NJ, Rice-Evans CA. 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS.+ radical cation assay. *Free Radic Res* 26:195-199.
40. Papadakis SE, Gardeli C, Tzia C. 2006. Spray drying of raisin juice concentrate. *Dry Technol* 24: 173-180.
41. Nunes GL. 2015. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. *J Food Eng* 151: 60-68.
42. Wojdylo A, Figiel A, Lech K, Nowicka P, Oszmianski J. 2014. Effect of convective and vacuum-microwave drying on the bioactive compounds, color, and antioxidant capacity of sour cherries. *Food Bioprocess Technol* 7: 829-841.
43. Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Res Int* 43: 907-914.
44. Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Kader AA. 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *J Agric Food Chem* 50: 4976-4982.
45. Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG. 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem* 68: 471-474.
46. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos, L, Byrne DH. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Comp Anal* 19: 669-675.
47. Çapanoğlu E, Beekwilder J, Boyacıoğlu D, De Vos RCH, Hall RD. 2010. The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants. *Crit Rev Food Sci* 50: 919-930.

## **GIDALARDA HİLE AMACIYLA KULLANILAN BAZI BİTKİ KAYNAKLI BİLEŞENLERİN GERÇEK ZAMANLI PZR İLE TESPİTİ**

**Zülal Kesmen<sup>1\*</sup>, Mine E. Büyükkiraz<sup>1</sup>, Neslihan Kahraman<sup>2</sup>, Hasan Yetim<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri/ Türkiye

<sup>2</sup>Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Kayseri Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Kayseri/ Türkiye

Geliş / Received: 20.12.2016; Kabul / Accepted: 10.02.2017; Online baskı / Published online: 16.03.2017

Kesmen, Z., Büyükkiraz, M.E., Kahraman, N., Yetim, H. (2017). Gıdalarda hile amacıyla kullanılan bazı bitkisel kaynaklı bileşenlerin gerçek zamanlı PZR ile tespiti. GIDA (2017) 42 (3): 305-314 doi: 10.15237/gida.GD16110

### **Öz**

Piyasa araştırmaları Ülkemizde ekonomik değeri yüksek bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine, hile amacıyla daha ucuz bitkisel ürünlerin kullanılabilirdiğini ortaya koymuştur. Bu şekilde yapılan üretimlerde, Antep fıstığı, kestane ve bademe yönelik tağşişli uygulamalar öne çıkmaktadır. Tüketicilerin korunması ve haksız rekabetin önlenmesi için bu tür hileli üretimlerin hassas ve güvenilir metotlar ile tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu çalışmada çeşitli gıda ürünlerinde Antep fıstığı yerine bezelye, kestane yerine fasulye ve badem yerine kayısı çekirdeğinin hile amaçlı kullanımlarını belirlemek için gerçek zamanlı PZR TaqMan probe tekniğine dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla bezelye ve fasulye türleri için kloroplast tRNA-Leu (*trnL*) geni, kayısı için de kromozomal S14 F-box protein geni üzerinde türe spesifik primer-prob setleri dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primer-prob setleri kullanılarak gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında, kayısı çekirdeğinin %0.1, bezelyenin %0.01 ve fasulyenin ise %0.001 seviyesine kadar diğer bitki türleri ile çapraz reaksiyon olmaksızın tespit edilebileceği ortaya konulmuştur. Diğer taraftan geliştirilen yöntemlerin, Antep fıstığı-bezelye, kestane-fasulye ve badem-kayısı çekirdeğinden oluşan ikili karışımlarda da başarılı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeğinin hassas ve güvenilir şekilde tespitine yönelik olarak geliştirilen yöntemlerin, bu bitki türlerinin hile amaçlı kullanımlarının belirlenmesi için yapılan rutin kontrollerde başarılı bir şekilde kullanılabilirdiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Gıda, tağşiş, bitki türleri, gerçek zamanlı PZR

## **DETECTION OF FRAUDULENT PRACTICES INVOLVING SOME PLANT DERIVED COMPOUNDS IN FOODS USING REAL-TIME PCR**

### **Abstract**

In this country, market research have revealed that there has been adulteration in food products in which some plant species have been replaced with plant ingredients that have a lower economic value. Fraudulent practices involving pistachios, chestnuts and almonds are prominent among these activities. For the protection of consumers and to prevent unfair competition in the market, the detection of fraudulent practices is required with precise and reliable methods. In this study, a new method based on the real-time PCR TaqMan probe technique was developed to determine the fraudulent use of pea instead of pistachio, apricot kernel instead of almond and common bean instead of chestnut in some food products. For this purpose, species-specific primer and probe sets were designed on the chloroplast tRNA-Leu (*trnL*) gene for pea and bean and also on the nuclear S14 F-box protein gene for apricot. In the real-time PCR reactions performed with the designed species specific primer and probe sets, apricot could be detected at the level of 0.1%, pea at the level of 0.01% and bean at the level of 0.001%, quantitatively, without any cross-reactivity with other plant species examined. Additionally, the developed method also provided successful detection in binary mixtures of the plants: pistachio-pea, chestnut-bean and apricot kernel-almond. As a result, it was concluded that the method provided a sensitive and reliable detection method for pea, bean and apricot kernel residues in foods, and it can successfully be used in the routine control of fraudulent practices involving these plant species in food products.

**Keywords:** Food, adulteration, plant species, real-time PCR

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ zkesmen@erciyes.edu.tr, © (+90) 352 207 6666/ 32729, ☎ (+90) 352 937 5784

## GİRİŞ

Piyasa araştırmaları, Ülkemizde ekonomik değeri yüksek bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine, hile amacıyla daha ucuz ürünlerin kullanılabilirdiğini ortaya koymuştur. Bu şekilde yapılan üretimlerde, birim fiyatının yüksek olması ve katıldıkları ürünlerde maliyeti artırıcı başlıca unsur olmaları nedeniyle, Antep fıstığı, kestane ve bademe yönelik tağşışlı uygulamalar dikkat çekici düzeylerde (1, 2).

Antep fıstığı, başta geleneksel ürünlerimiz baklava olmak üzere, tatlı ve şekerleme sektöründe üretilen pek çok üründe yaygın kullanımı olan önemli bir maliyet unsurudur. Bu nedenle bu tür ürünlerde Antep fıstığı yerine bezelye kullanımı son yıllarda oldukça yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Özellikle tüketimin yoğun olduğu dini bayramlar öncesinde bu tip hilelerin daha da arttığı öne sürülmektedir. Ayrıca pasta, şekerleme ve benzeri ürünlerde badem yerine kayısı çekirdeği ya da kestane içeren ürünlerde kestane yerine püre haline getirilmiş kuru fasulye kullanımı, ülkemizde bitki kaynaklı gıda katkısı veya bileşenlerinin tağşışına yönelik diğer güncel uygulamalar arasındadır (1-3).

Gıda sanayisinde karşılaşılan hileli üretimler, tüketicilerin aldatılması ve ekonomik kayıplara uğramasına, üreticilerin ise haksız rekabet sebebiyle zarar görmesine neden olmaktadır. Tüm bu sakıncalarının yanı sıra bu tip hileler, toplumsal etik açısından da rahatsızlık oluşturmakta ve gıda sektörüne duyulan güveni azaltmaktadır. Gıdalarda hile amaçlı uygulamalara yönelik yasal süreçlerin başlatılması ve itiraza yol açmayacak şekilde tamamlanabilmesi için, bu tür uygulamalara ilişkin kanıtların açık bir şekilde ortaya konulması gerekmektedir. Gıdaların kendine özgü karmaşık bileşimi ve üretiminde uygulanan teknolojik işlemler yapısında bulunan bileşenlerin, duyuşsal olarak veya basit analiz teknikleri ile tespitini zorlaştırmaktadır. Bu amaçla diagnostik alanındaki gelişmelerin yakından takip edilerek yeni analiz metotlarının geliştirilmesi ve hile tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak da mevcut analiz metotlarının güncellenmesi gerekmektedir (4). Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler başta polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tekniği olmak üzere nükleik asitlerin analizine dayalı birçok yeni tekniğin gıda analizlerinde kullanımına imkân vermiştir (5). Son yıllarda, klasik PZR'ye kıyasla

hassasiyeti ve spesifitesi daha yüksek olan ve kantitatif analize de imkan veren gerçek zamanlı PZR tekniği, gıda kalite kontrolünde karşılaşılan pek çok soruna çözüm olabilecek potansiyel bir teknik olarak öne çıkmaktadır (6, 7). Gerçek zamanlı PZR tekniğine dayalı pek çok yöntem mevcut olmakla birlikte "TaqMan probe" yöntemi tür tayini amacıyla yapılan çalışmalarda daha fazla tercih edilmektedir. TaqMan probe yönteminde, çoğaltılmak istenilen hedef DNA dizisine tamamlayıcı, PZR sırasında serbest hale geçerek sinyal oluşturan, floresan boya ile işaretleymiş bir prob kullanılmaktadır (8).

Gerçek zamanlı PZR "TaqMan probe" yönteminin gıdaların yapısında bulunan bitki kaynaklı bileşenleri belirlemede başarıyla kullanılabilirdiği bildirilmiştir. Arlorio ve ark. (9) ticari gıda ürünlerinde bulunan fındık kalıntısını TaqMan prob tekniği ile 0.1 ng seviyesine kadar tespit edebilmişlerdir. TaqMan prob tekniğinin kullanıldığı başka bir çalışmada Demmel ve ark. (10), acı bakla bitkisinin pişmiş pizzalardaki deteksiyon limitini 1 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Lopez (11) tarafından, *Betaine aldehyde dehydrogenase 2 (BAD2)* geni üzerinde dizayn edilen primerler ve TaqMan prob kullanılarak basmati pirinçlerine basmati olmayan pirinçlerin eklenip eklenmediğini % 1 seviyesine kadar tespit edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar gerçek zamanlı PZR TaqMan prob yönteminin, gıdaların yapısında bulunan bitki kaynaklı bileşenlerin tespitinde kullanılabilirdiği yüksek hassasiyete sahip spesifik bir yöntem olduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu çalışmada da ekonomik değeri yüksek bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine (Antep fıstığı, kestane ve badem) hile amacıyla kullanılan, daha ucuz bitkisel ürünlerin (bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeği) tespiti için gerçek zamanlı PZR TaqMan probe tekniğine dayalı yöntemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada bezelye, fasulye, kayısı (kayısı çekirdeği) türlerinin tespiti için gerçek zamanlı PZR'ye dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemler, bezelye-Antep fıstığı, fasulye-kestane, kayısı çekirdeği-badem ile hazırlanan ikili karışımlarda test edilerek hile amaçlı uygulamalarda kullanılabilirliği belirlenmiştir.

### Örneklerin analize hazırlanması

Çalışmada hedef alınan bitki türlerinden bezelye (*Pisum sativum* L.) ve fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) kuru taneleri, kayısının (*Prunus armeniaca* L.) ise çekirdek içi kullanılmıştır. İkili karışımların hazırlanmasında kullanılan, Antep fıstığı, badem ve kestane örnekleri taze meyve olarak temin edilmiştir. Bunların dışında ayrıca hedef bitki türleri ile akraba olan veya gıda maddelerinin üretiminde yaygın olarak kullanılan 25 adet farklı bitki türü de spesifite testleri için kullanılmıştır (Çizelge 1). Her bir bitki türü için Kayseri'deki farklı satış noktalarından en az 3 adet örnek toplanmıştır.

Çalışma kapsamında kullanılan tüm bitki türlerine ait örnekler etüvde kurutulularak suyu uzaklaştırılmıştır. Ayrıca Antep fıstığı, badem, kayısı çekirdeği, fındık, yer fıstığı, ceviz gibi yağ oranı yüksek bitki türleri blendırda öğütüldükten sonra 1:3 hacim hekzanla 30°C'de 30 dakika muamele edilmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanarak yağları uzaklaştırılmıştır. DNA izolasyonundan önce kurutulan ve yağı alınan örnekler sıvı azot ile doku parçalayıcıda (Retsch/MM 400/Germany) öğütülerek boyutları yaklaşık 10 µm'ye kadar küçültülmüştür.

Çizelge 1. Spesifite testinde kullanılan bitki türleri  
Table 1. Plant species used for specificity test

Örnek No Sample No	Örnek Adı Sample Name	Örnek Kodu Sample Code	Latince isim Scientific name	Örnek sayısı Number of Sample
1	Antep fıstığı <i>Pistachio</i> (Antep)	AF	<i>Pistacia vera</i>	6
2	At kestanesi <i>Horse chestnut</i>	AK	<i>Aesculus hippocastanum</i>	10
3	Badem <i>Almond</i>	BD	<i>Prunus dulcis</i>	10
4	Bakla <i>Broad bean</i>	BK	<i>Vicia faba</i>	3
5	Barbunya <i>Cranberry bean</i>	BR	<i>Phaseolus vulgaris</i>	6
6	Bezelye <i>Pea</i>	BZ	<i>Pisum sativum</i>	4
7	Buğday <i>Wheat</i>	BG	<i>Triticum aestivum</i>	3
8	Ceviz <i>Walnut</i>	CV	<i>Juglans regia</i>	3
9	Erik <i>Plum</i>	ER	<i>Prunus domestica</i>	3
10	Fasulye <i>Bean</i>	FS	<i>Phaseolus vulgaris</i>	10
11	Fındık <i>Hazelnut</i>	FN	<i>Corylus colurna</i>	3
12	Kakao <i>Cacao</i>	KK	<i>Theobroma cacao</i>	3
13	Kayısı <i>Apricot</i>	KY	<i>Prunus armeniaca</i>	3
14	Kestane <i>Chestnut</i>	KS	<i>Castanea sativa</i>	10
15	Kırmızı mercimek <i>Red lentil</i>	KM	<i>Lens culinaris</i>	3
16	Kiraz <i>Sweet cherry</i>	KR	<i>Prunus avium</i>	3
17	Menengiç <i>Terebinth</i>	MN	<i>Pistacia terebinthus</i>	3
18	Mısır <i>Maize</i>	MS	<i>Zea mays</i>	3
19	Nohut <i>Chickpea</i>	NH	<i>Cicer arietinum</i>	3
20	Siirt fıstığı <i>Pistachio</i> (Siirt)	SF	<i>Pistacia vera, pistachio</i>	4
21	Şeftali <i>Peach</i>	ŞF	<i>Prunus persica</i>	3
22	Vişne <i>Sour cherry</i>	VŞ	<i>Prunus cerasus</i>	3
23	Yer fıstığı <i>Peanut</i>	YF	<i>Arachis hypogaea</i>	3
24	Yeşil mercimek <i>Green lentil</i>	YM	<i>Lens culinaris</i>	3
25	Yonca <i>Clover</i>	YN	<i>Medicago sativa</i>	3

### İkili Karışımların Hazırlanması

Homojen karışımlar hazırlamak amacıyla çok aşamalı bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Bunun için başlangıçta 20:20 (g:g) oranında Antep fıstığı:bezelye, kestane:fasulye ve badem:kayısı çekirdeği karıştırılarak %50'lik ilk karışımlar hazırlanmış daha sonra Antep fıstığı, kestane veya badem (A grubu) her defasında karışım ağırlığının %40 veya %50'si oranında bir önceki karışıma, ilave edilmiştir. Böylece karışım içerisindeki bezelye, fasulye veya kayısı çekirdeğinin (B grubu) oranı %0.001'e kadar düşürülmüştür (Çizelge 2). İkili karışımların 10 farklı seviyesinden DNA izolasyonu yapılmış ve türe spesifik primer-prob setleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR TaqMan prob yöntemi ile analiz edilmiştir.

### DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Doyle (12) tarafından bildirilen yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Ön işlemlerden geçirilerek hazırlanan saf bitki türleri ve ikili karışımlardan yaklaşık 100 mg örnek alınıp, üzerine 600 µl %1 β-merkaptto etanol içeren liziz (%2 CTAB, 1.4M NaCl, 100mM Tris, 20mM EDTA) buffer eklendikten sonra 65°C'de

Çizelge 2. Bitki türleri ile hazırlanan ikili karışımlar  
Table 2. Binary mixtures prepared with plant species

Karışım No Mixture No	İkili karışımları hazırlamada kullanılan bitki örneğinin miktarı (g) Amount of plant sample used to prepare binary mixtures (g)			Karışım içerisindeki B grubu bitki örneğinin** oranı The proportion of group B plant sample** in mixture
	A grubu bitki örneğinin* miktarı The amount of plant sample in group A*	B grubu bitki örneğinin** miktarı The amount of plant sample in group B**	A grubu bitkilerin* ilave edildiği karışım no Mixture number in which group A* plants are added	
1	20	20		%50
2	20	-	1	%25
3***	30	-	2	%10
4***	20	-	3	%5
5	30	-	4	%2
6***	20	-	5	%1
7***	20	-	6	%0.5
8	30	-	7	%0.2
9***	20	-	8	%0.10
10***	20	-	9	%0.05
11	30	-	10	%0.02
12***	20	-	11	%0.010
13***	20	-	12	%0.005
14	30	-	13	%0.002
15***	20	-	14	%0.0010

\*A grubu bitkiler: Antep fıstığı, kestane ya da badem \* Group A plants: pistachio, chestnut or almond

\*\*B grubu bitkiler: Bezelye, fasulye ya da kayısı çekirdeği \*\* Group B plants: pea, bean or apricot

\*\*\* Analiz edilen ikili karışımlar \*\*\* Analyzed binary mixtures

(Bioer-Thermo Cell-HB-202, China) bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 250 µl sodyum asetat eklenip -80 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Kısa bir süre oda sıcaklığında bekletilip çözdürüldükten sonra 16000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe alınarak önce fenol; kloroform; izoamilalkol (25:2:1) daha sonra aynı miktarda kloroform; izoamilalkol (24:1) ile yıkama işlemi yapılmıştır. Her yıkamadan sonra tüpler 20000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz yeni tüpe alınmıştır. Soğuk izopropanol eklenip 20000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürülen DNA'lar üst faz uzaklaştırıldıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. DNA'lar 100 µl TE (10mM Tris, 1mM EDTA) buffer içerisinde çözdürülmüş ve 4 µl RNAaz eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. DNA konsantrasyonu nanodrop (ACTGene, UVS-99) ile ölçülüp TE buffer ile 100 ng/µl'ye ayarlanmıştır.

#### Türe spesifik primer ve prob setlerinin dizaynı

Çalışmada bezelye, kayısı ve fasulye türlerine spesifik primer ve prob setlerinin dizaynı için kloroplast genomun tRNA-Leu (*trnL*) geni üzerinde türe spesifik dizileri hedef alınmıştır.

Kayısı türüne spesifik primer-prob seti ise, kromozomal S14 F-box protein geni hedef alınarak dizayn edilmiştir (Çizelge 3). Ayrıca yanlış negatif sonuçların önlenmesi için de universal bir bitki primer-prob seti kullanılmıştır (13).

Dizayn edilen primer ve prob setlerinin spesifite testlerinde Çizelge 1'de verilen bitki türlerinin 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA'ları kullanılarak bu DNA'lar ile reaksiyon verip vermediği tespit edilmiştir.

Hassasiyet testi için, bezelye, fasulye ve kayısının 100 ng/µl'lik DNA konsantrasyonu %100 seviyesi kabul edilmiş ve %0.001 seviyesine (0.0001 ng DNA/µl) kadar 7 farklı konsantrasyonda dilüsyonlar hazırlanmıştır. Bu seri dilüsyonlar kullanılarak herbir primer ve prob seti için deteksiyon limiti belirlenmiştir. Ayrıca her bir dilüsyona ait DNA konsantrasyonlarının logaritmik değerine karşı tespit edilen Ct değerleri kullanılarak standart kurve oluşturulmuştur.

#### Gerçek Zamanlı PZR analizi

Gerçek zamanlı PZR işlemi ticari master mix (DNA probe master, Roche, ABD), 50-100 ng template DNA (2 µl), 0.4 µM forward ve reverse primerlerden

Çizelge 3. Bitki türlerine spesifik olarak dizayn edilen primer-prob setleri  
Table 3. Primer-probe sets designed specifically for plant species

Türler <i>Species</i>	Oligonükleotid <i>Oligonucleotide</i>	Oligonükleotid dizisi (5'→3') <i>Sequence of oligonucleotide (5'→3')</i>	Amplikon uzunluğu (bç) <i>Length of amplicon (bp)</i>	Hedef gen ve (Genbank erişim no) <i>Target gene and (Accession no)</i>	Kaynak <i>Reference</i>
Bezelye <i>Pea</i>	BF (ileri) <i>BF (Forward)</i>	CAATTGATTAATGAAGATTTCTAACTTCT	117	<i>trnL</i> (JN617165.1)	Bu çalışma <i>This study</i>
	BR (geri) <i>BR (Reverse)</i>	TTTGAGCAATGAATATTCAGTCA			
	BP (prob) <i>BP (probe)</i>	TGGAAACATTAGAATCAATTACAACCTGGA			
Fasulye <i>Bean</i>	FF (ileri) <i>FF (Forward)</i>	TGAAGAAAAGATGGAATATTTCTTGAT	93	<i>trnL</i> (JN617174.1)	Bu çalışma <i>This study</i>
	FR (geri) <i>FR (Reverse)</i>	TTTATTCTCATCTGATTGATCAGTTCT			
	FP (prob) <i>FP (probe)</i>	TCACCTTATCATAATCGGATAAAACCCCTTGA			
Kayısı <i>Apricot</i>	KF (ileri) <i>KF (Forward)</i>	CAACAGGGATTAGTATGGATAACA	120	S14 F-box protein (DQ897929.1)	Bu çalışma <i>This study</i>
	KR (geri) <i>KR (Reverse)</i>	GGATTTCGTAATCACATAAATCCAG			
	KP (prob) <i>KP (probe)</i>	ATGCTAAGAGTAGATGACATTAGAGGCATAAGA			
Bitki (genel) <i>Plant (common)</i>	Plant nes-2-f (ileri) <i>Plant nes-2-f (Forward)</i>	ATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTA	90	<i>trnL</i>	(13)
	Plant nes-2-r (geri) <i>Plant nes-2-r (Reverse)</i>	GGATTTGGCTCAGGATTGCC			
	Plant nes-2-prob <i>Plant nes-2- (probe)</i>	TTAATTCCAGGGTTTCTCTGAATTTGAAAGTT			

bç: baz çifti bp: base pair

her biri ve 0.1 µM TaqMan probe kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlarda 5' ucundan FAM ve 3' ucunda ise TAMRA bulunan çift işaretlenmiş proplar kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PZR için termal döngü parametreleri; 94 °C'de ilk denatürasyonun ardından, 35 döngü süresince 94 °C'de denatürasyon ve 55 °C'de yapışma/uzama olarak uygulanmıştır. PZR ürünleri % 1.5'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Türe spesifik primer ve prob setlerinin spesifite ve hassasiyet testi sonuçları

Spesifite testleri için 25 bitki türüne ait toplam 111 örneğin 100 ng/µl konsantrasyondaki DNA'ları kullanılmıştır. Çalışma kapsamında dizayn edilen fasulye ve kayısı türlerine spesifik primer-prob setlerinin diğer bitki türleri ile reaksiyon vermediği yalnızca spesifik oldukları türler ile reaksiyona girdiği tespit edilmiştir

(Çizelge 4). Bezelye türüne spesifik primer-prob setinin ise, yeşil mercimek ile oldukça zayıf bir çapraz reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Öyle ki bu primer-prob setinin, %100 mercimek DNA'sı (100 ng DNA/µl) ile verdiği Ct değeri, %0.01 bezelye DNA'sı (0.01 ng DNA/µl) için belirlenen Ct değerinden bile daha düşük bulunmuştur. Çalışmada kullanılan universal bitki primer-prob seti ile tüm bitki örneklerine ait DNA'ların (15.54-22.41) arasında değişen Ct değerleri verdiği belirlenmiş ve böylece yanlış negatif sonuçların kontrolü yapılmıştır.

Bu çalışmada, baklagiller (*Fabaceae*) familyasından bezelye ve fasulye türlerine spesifik primer-prob setlerinin dizaynı için kloroplast genomda bulunan *trnL* geni üzerinde sırasıyla 117 ve 93 baz çifti uzunluğundaki bölgeler hedef alınmıştır. Kloroplast genomda bulunan *trnL* geni, bitki türleri arasındaki heterojenliğinin ve kopya sayısının yüksek olmasından dolayı filogenetik çalışmalar için avantaj sağlamaktadır (14).

Çizelge 4. Dizayn edilen primer ve prob setlerinin spesifite ve hassasiyet testi sonuçları.  
Table 4. The specificity and sensitivity test results of designed primer and probe sets.

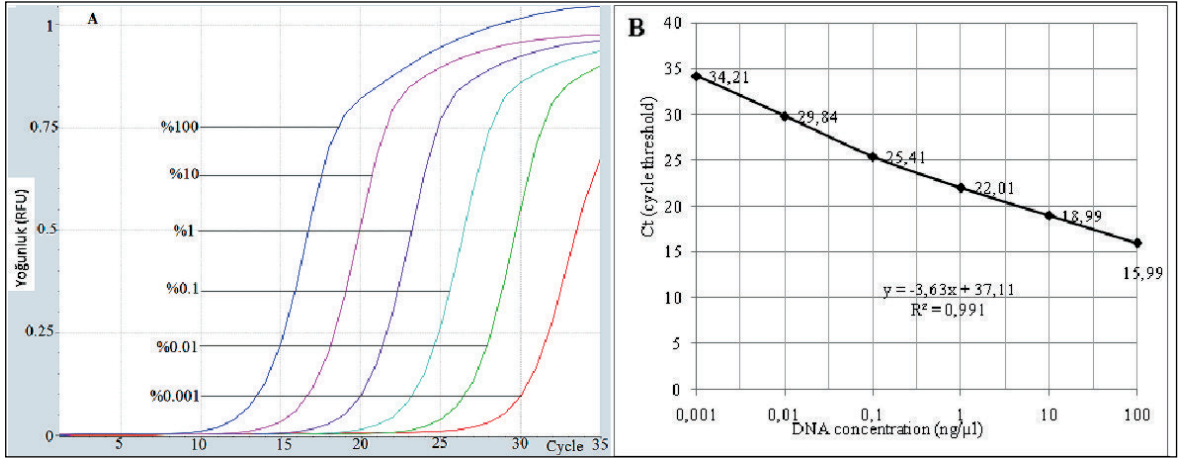
Türler <i>Species</i>	DNA Konsantrasyonu (%) <i>DNA Concentration (%)</i>	Bezelye <i>Pea</i>	Fasulye <i>Bean</i>	Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>
Hedef Türler <i>Target Species</i>	0.0001	>35	>35	>35
	0.001	34.21	32.11	>35
	0.01	29.84	28.41	>35
	0.1	25.41	25.72	30.71
	1	22.01	22.12	27.37
	10	18.2	18.75	23.12
	100	15.99	16.38	19.45
Antep fıstığı <i>Pistachio (Antep)</i>	100	>35	>35	>35
At kestanesi <i>Horse chestnut</i>	100	>35	>35	>35
Badem <i>Almond</i>	100	>35	>35	>35
Bakla <i>Broad bean</i>	100	>35	>35	>35
Barbunya <i>Cranberry bean</i>	100	>35	>35	>35
Bezelye <i>Pea</i>	100	15.99	>35	>35
Buğday <i>Wheat</i>	100	>35	>35	>35
Ceviz <i>Walnut</i>	100	>35	>35	>35
Erik <i>Plum</i>	100	>35	>35	>35
Fasulye <i>Bean</i>	100	>35	16.38	>35
Fındık <i>Hazelnut</i>	100	>35	>35	>35
Kakao <i>Cacao</i>	100	>35	>35	>35
Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>	100	>35	>35	19.45
Kestane <i>Chestnut</i>	100	>35	>35	>35
Kırmızı mercimek <i>Red lentil</i>	100	>35	>35	>35
Kiraz <i>Sweet cherry</i>	100	>35	>35	>35
Menengiç <i>Terebinth</i>	100	>35	>35	>35
Mısır <i>Maize</i>	100	>35	>35	>35
Nohut <i>Chickpea</i>	100	>35	>35	>35
Siirt fıstığı <i>Pistachio (Siirt)</i>	100	>35	>35	>35
Şeftali <i>Peach</i>	100	>35	>35	>35
Vişne <i>Sour cherry</i>	100	>35	>35	>35
Yer fıstığı <i>Peanut</i>	100	>35	>35	>35
Yeşil mercimek <i>Green lentil</i>	100	31.53	>35	>35
Yonca <i>Clover</i>	100	>35	>35	>35

>35: ct değeri tespit edilmedi. >35: ct value was not detected.

Kayısı türüne spesifik primer ve prob dizaynı için kromozomal S14 F-box protein geni kullanılmıştır. Kromozomal genomda bulunan genlerin kopya sayısı kloroplast genlerden çok daha düşük olduğu için kayısı için deteksiyon limiti diğer iki türden çok daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte *Prunus* cinsi içerisinde yakın ilişkili iki tür olan kayısı (*Prunus armeniaca*) ve badem (*P. dulcis*) birbirinden başarılı bir şekilde ayırt edilmiştir. Ayrıca kayısı türü için tasarlanan primer-prob setinin aynı cinse ait kiraz (*P. avium*), şeftali (*P. persica*), vişne (*P. cerasus*) ve erik (*P. domestica*) gibi diğer sert çekirdekli meyvelerle reaksiyon vermediği tespit edilmiştir.

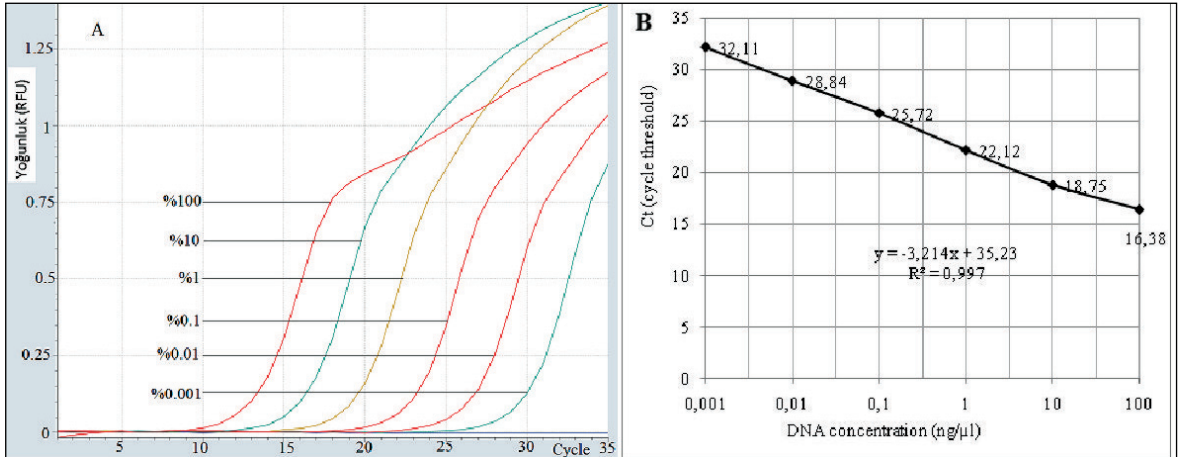
Diğer taraftan hassasiyet testi için bezelye, fasulye ve kayısı türlerine ait DNA'ların %0.001'den %100'e kadar değişen konsantrasyonlarındaki dilüsyonları kullanılmış ve gerçekleştirilen gerçek zamanlı PZR reaksiyonları sonucunda bezelye ve fasulye için deteksiyon limiti %0.001, kayısı için ise %0.1 olarak belirlenmiştir (Şekil 1-3). Her bir primerin spesifite ve hassasiyet testi için gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri, gerçek zamanlı PZR sonuçlarını doğrulamıştır (Şekil 4-6).





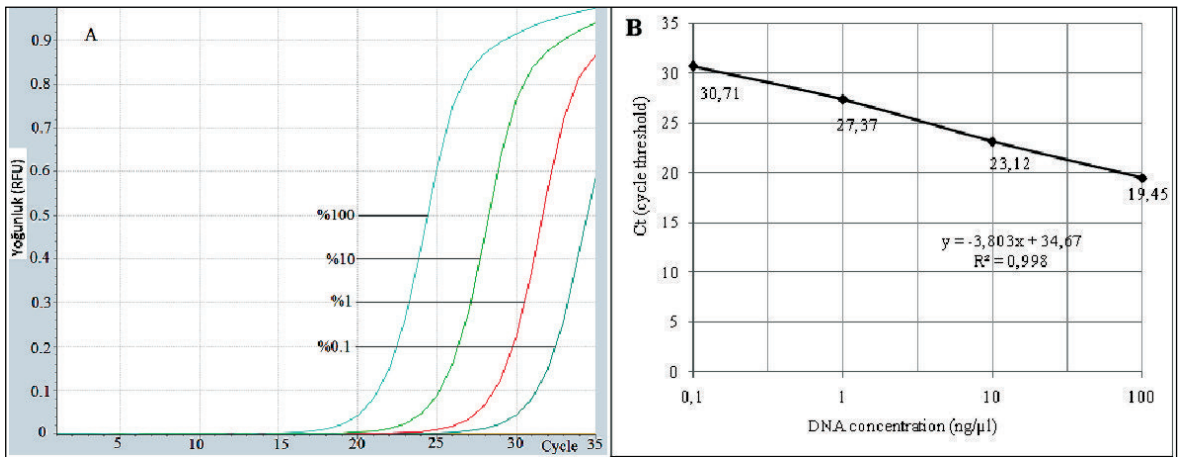
Şekil 1. Bezelye DNA'sının farklı konsantrasyonlarına karşılık belirlenen Ct değerleri (A) ve Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri (B)

Figure 1. Ct values determined using different concentrations of pea DNA (A) and the standard curve plotted for Ct values (B)



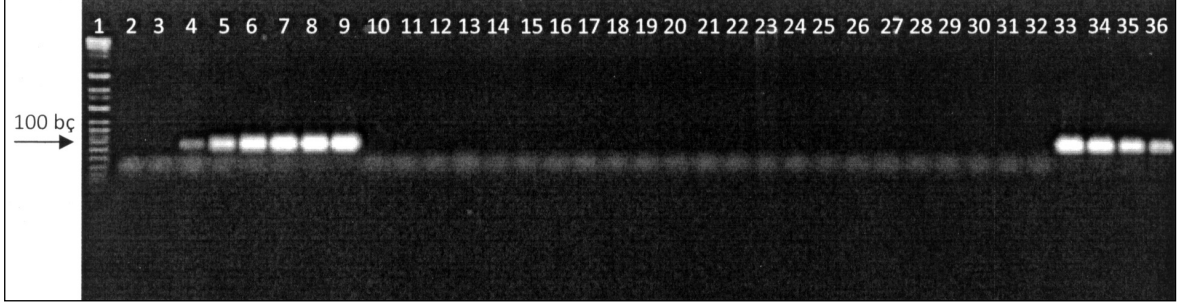
Şekil 2. Fasulye DNA'sının farklı konsantrasyonlarına karşılık belirlenen Ct değerleri (A) ve Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri (B)

Figure 2. Ct values determined using different concentrations of bean DNA (A) and the standard curve plotted for Ct values (B)



Şekil 3. Kayısı DNA'sının farklı konsantrasyonlarına karşılık belirlenen Ct değerleri (A) ve Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğri (B)

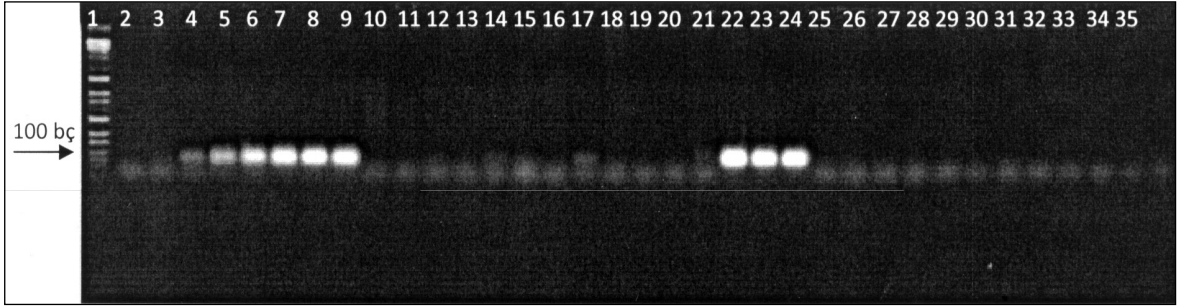
Figure 3. Ct values determined using different concentrations of apricot DNA (A) and the standard curve plotted for Ct values (B)



Şekil 4. Bezelye türüne spesifik primerlerin hassasiyet ve spesifite testine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Figure 4. Agarose gel electrophoresis image of sensitivity and specificity test for pea specific primers.

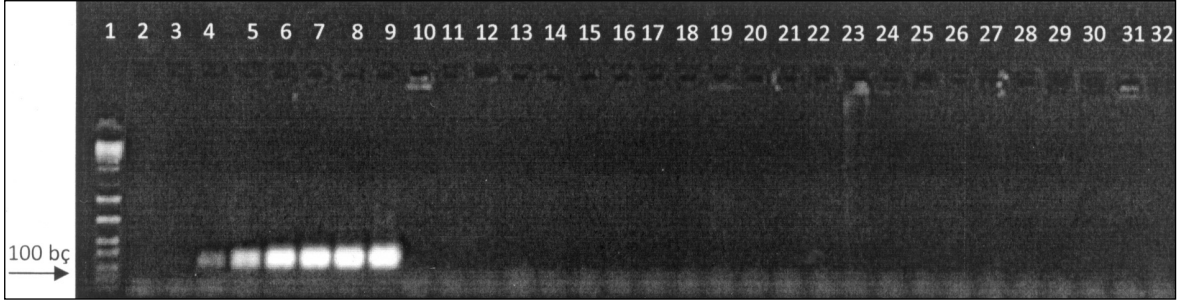
1:Marker, 2: Negatif Kontrol, 3: % 0,0001'lik BZ, 4: % 0,001'lik BZ, 5: % 0,01'lik BZ, 6: % 0,1'lik BZ, 7: % 1'lik BZ, 8: % 10'luk BZ, 9: % 100'lük BZ, 10: AF, 11: BD, 12: BK, 13: BR, 14: BG, 15: CV, 16: ER, 17: FS, 18: FN, 19: KK, 20: KY, 21: KS, 22: KM, 23: KR, 24: MN, 25: MS, 26: NH, 27: SF, 28: ŞF, 29: VŞ, 30: YF, 31: YM, 32: YN, 33: BZ1, 34: BZ2, 35: BZ3, 36: BZ4



Şekil 5. Fasulye türüne spesifik primerlerin hassasiyet ve spesifite testine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Figure 5. Agarose gel electrophoresis image of sensitivity and specificity test for bean specific primers.

1:Marker, 2:Negatif Kontrol, 3:% 0,0001'lik FS, 4:% 0,001'lik FS, 5:% 0,01'lik FS, 6:% 0,1'lik FS, 7:% 1'lik FS, 8:% 10'luk FS, 9:% 100'lük FS, 10: AF, 11: BD, 12: BK, 13: BR, 14: BG, 15: CV, 16: ER, 17: FS, 18: FN, 19: KK, 20: KY, 21: KS, 22: FS1, 23: FS2, 24: FS3, 25: KM, 26: KR, 27: MN, 28: MS, 29: NH, 30: SF, 31: ŞF, 32: VŞ, 33: YF, 34: YM, 35: YN



Şekil 6. Kayısı türüne spesifik primerlerin hassasiyet ve spesifite testine ait agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Figure 6. Agarose gel electrophoresis image of sensitivity and specificity test for apricot specific primers.

1:Marker, 2:Negatif Kontrol, 3: % 0,01'lik KY, 4: % 0,1'lik KY, 5: % 1'lik KY, 6: % 10'luk KY, 7: % 100'lük KY, 8: KY1, 9: KY2, 10: AF, 11: BD, 12: BK, 13: BR, 14: BG, 15: CV, 16: ER, 17: FS, 18: FN, 19: KK, 20: KY, 21: KS, 22: KM, 23: KR, 24: MN, 25: MS, 26: NH, 27: SF, 28: ŞF, 29: VŞ, 30: YF, 31: YM, 32: YN

Her bir DNA konsantrasyonuna karşı elde edilen Ct değerleri kullanılarak çizilen standart eğrinin eğimi bezelye, fasulye ve kayısı türleri için sırası ile -3.70, -3.18 ve -3.80 olarak bulunmuştur. Ayrıca tüm primer-prob setleri için, R<sup>2</sup> değerinin 0.99 olduğu tespit edilmiştir.

#### İkili Karışımlarda Tür Tayini

Hazırlanan ikili karışımlar, hedef bitki türlerine spesifik primer ve prob seti kullanılarak analiz edilmiştir. Buna göre, Antep fıstığı-bezelye karışımında bezelye, kestane-fasulye karışımında ise fasulye, %0.001 seviyesine kadar tespit edilebilirken, badem-kayısı karışımında kayısının tespit edilebildiği en düşük seviye %0.1 olmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 5. İkili karışımların analiz sonuçları  
Table 5. Analysis results of binary mixtures

İkili karışım seviyesi (A grubu bitki türü* içindeki B grubu bitki türünün** oranı) Level of binary mixture (Ratio of B group plant species** in A group plant species*)	Türe spesifik primer ve prob setleri kullanılarak elde edilen Ct değerleri Ct values obtained with species-specific primer and probe sets		
	Bezelye Pea	Fasulye Bean	Kayısı Apricot
%100	17.127	14.345	20.045
%10	19.527	16.925	21.925
%5	22.667	18.027	23.027
%1	23.222	21.614	25.614
%0.5	23.823	22.18	27.189
%0.1	27.804	24.16	28.161
%0.05	29.454	25.183	29.183
%0.01	31.008	27.575	31.575
%0.005	31.057	28.573	>35
%0.001	31.335	30.046	>35
Negatif Kontrol Negative Control	>35	>35	>35

\* A grubu bitkiler: Antep fıstığı, kestane ya da badem \* Group A plants: pistachio, chestnut or almond

\*\*B grubu bitkiler: Bezelye, fasulye ya da kayısı çekirdeği \*\* Group B plants: pea, bean or apricot

Antep fıstığı-bezelye ikili karışımının analizinde kullanılan bezelye türüne spesifik ileri ve geri primerler, Antep fıstığı ile sırasıyla %52.8 ile %50 prob ise %44.7 oranında benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde, fasulye türüne spesifik ileri ve geri primeler ile prob kestane ile sırasıyla %44.7, %51.2 ve %61.3 oranında benzerdir. Kayısı primer-prob setinin badem türü ile arasındaki benzerlik oranları ise sırasıyla %79.2, %91.7 ve %81.8'dir. Dolayısıyla hedef diziler arasında yüksek heterojenlik analiz edilen primer-prob setlerinin karışımdaki diğer türlerle reaksiyon vermeksizin yüksek bir hassasiyetle hedef bitki türlerinin tayinine imkân vermiştir. Hile amaçlı karışımlarda (adultration) %1'in altı ekonomik bulunmamakta genellikle bu seviyenin üstünde bir karıştırma yapılmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada ikili karışımlar için tespit edilen deteksiyon limitleri bu tür hileleri tespit edebilecek hassasiyettedir.

Literatürde benzer çalışmalar bulunmakla birlikte bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntemler, gerek spesifite ve gerekse hassasiyet bakımından daha başarılı bulunmuştur. Örneğin; Brezná ve ark. (15), gıdalardaki bezelye kalıntılarını tespit etmek amacıyla *trnL* ve *trnF* eksonları arasındaki intron bölgeyi hedef alan bir primer-prob seti tasarlamışlardır. Geliştirdikleri gerçek zamanlı PZR çalışması ile bezelye ilave edilmiş çeşitli tahıl unlarında deteksiyon limitini  $0.11 \pm 0.07$  ng bezelye DNA'sı olarak tespit etmişlerdir. Ancak tasarlanan primer ve prob setlerinin diğer baklagillerle reaksiyon vermemesi için döngü sayısını 29'da tutmuşlardır. Krahulcová ve ark. (16), kestane

püresine hile amacıyla katılan fasulye türünü tespit etmek amacıyla, nükleer genom üzerinde bulunan PvLEA-18 genini kullanmışlardır. Dizayn ettikleri primerlerin diğer bitki türleriyle reaksiyon vermediğini ancak model karışımlarda fasulyenin deteksiyon limitinin %1 (w/w) olduğunu bildirmişlerdir. Brüning ve ark. (17) ise, badem ezmesine (marzipan) karıştırılan kayısı çekirdeği ezmesinin (persipan) kayısı türüne spesifik PZR ile %0.2 seviyesine kadar tespit edilebildiğini göstermişlerdir.

## SONUÇ

Gıda sanayisinde kaliteli ve güvenilir ürünlerin üretilmesi, tüketici haklarının korunması ve haksız rekabetin önlenmesi için gıda kontrol ve denetim hizmetlerinin etkin, yaygın ve sürekli olması büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla gerek kalite kontrol hizmetlerinin etkinliği ve gerekse pek çok ülkede gıda etiketleme ile ilgili yapılan yasal düzenlemeler, gıdaların bileşiminde bulunan hayvan ve bitki kaynaklı bileşenlerin tayini için hassas ve güvenilir metotlara duyulan ihtiyacı artırmıştır. İşte bu noktada gerçek zamanlı PZR tekniği, tür tayini ile ilgili bu yöndeki ihtiyaçları karşılayabilecek potansiyel bir teknik olarak öne çıkmaktadır.

Bu çalışmada, Antep fıstığı, kestane ve badem gibi bitki kaynaklı bazı gıda bileşenlerinin yerine hile amacıyla kullanılan bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeği gibi daha ucuz bitki türlerinin tespitine yönelik yöntemler geliştirilmiştir. Bu amaçla *trnL*

geni üzerinde dizayn edilen primer-prob setleri, bezelye ve fasulye türlerinin spesifik olarak ve yüksek bir hassasiyetle tespitini sağlamıştır. S14 F-box geni üzerinde dizayn edilen kayısı türüne spesifik primer-prob setinin ise, *Prunus* cinsi içerisindeki yakın ilişkili türlerin ayırımına imkan sağladığı ancak diğer türlere kıyasla hassasiyetinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Geliştirilen tüm yöntemlerin, kalite kontrol laboratuvarlarının yöntem konusundaki eksikliğini gidermesinin yanında, rutin kullanımlara uygun ticari test kitlerine dönüştürülme potansiyeli de mevcuttur. Sonuçta hileli karışımlar içerisindeki bezelye, fasulye ve kayısı çekirdeği kalıntılarının hassas ve güvenilir bir şekilde tespiti, bu yolla yapılan hilelerin önlenmesi ve dolayısıyla ve tüketicilerin korunması ve haksız rekabetin önlenmesine katkı sağlayacaktır.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından TAGEM 11/AR-GE/08 No'lu proje ile desteklenmiştir.

### KAYNAKLAR

1. Şenöz, B. (2013). Gıdalarda yapılan taklit/tağşişler ve gıdaların coğrafi kökeninin tespitinde analiz yöntemlerinin yeri. 8. Gıda Mühendisliği Kongresi Sunumları. <http://www.gidamuhendisligikongresi.org/images/onuc/dda6cea62dfe385.pdf> (Erişim tarihi 18 Kasım 2016).
2. Kardelen Kestane Şekeri (2015). Ucuz kestane şekerinin içeriği ortaya çıkacak. <http://www.kardelen.com/detay?q=47> (Erişim tarihi 27 Kasım 2016).
3. Ankara Ticaret Odası (2005). Sahte Türkiye raporu. <http://www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=269&l=1> (Erişim tarihi 14 Kasım 2016).
3. Kalkınma Bakanlığı (2014). Gıda ürünleri ve güvenilirliği. T.C. Kalkınma Bakanlığı, Onuncu Kalkınma Planı (2014-2018), Özel İhtisas Komisyonu Raporu, s. 41. Ankara
5. Özatay Ş. (2012). Moleküler metotların gıda kontrollerindeki uygulama alanları. *Türk Bil. Der. Derg.*, 5: 75-81, ISSN: 1308-0040.
6. Güllüce, A., Kesmen, Z. (2013). Real-time PCR tekniği ve gıda analizlerinde kullanımı. *Gıda Teknolojisi*, 17: 84-88.

7. Ma, H., Shieh, K.J., Chen, G., Qiao, X., Chuang, M.Y. (2006). Application of real time polymerase chain reaction (RT-PCR). *J Am Sci*, 2: 1-15, ISSN 1545-1003
8. Wolf, C., Lüthy, J. (2001). Quantitative competitive (QC) PCR for quantification of porcine DNA. *Meat Sci*, 57: 161-168. doi: 10.1016/S0309-1740(00)00088-7.
9. Arlorio, M., Cereti, E., Co sson, J.D., Travaglia, F., Martelli, A. (2007). Detection of hazelnut (*Corylus* spp.) in processed foods using real-time PCR. *Food Control*, 18: 140-148. doi:10.1016/j.foodcont.2005.09.005.
10. Demmel, A., Hupfer, C., Busch, U., Engel, K.H. (2011). Detection of lupine (*Lupinus* spp.), DNA in processed foods using real-time PCR. *Food Control*, 22: 215-220. doi:10.1016/j.foodcont.2010.07.001.
11. Lopez, S.J. (2008). TaqMan based real-time PCR method for quantitative detection of basmati rice adulteration with non-basmati rice. *Eur Food Res Technol*, 227: 619-622. doi: 10.1007/s00217-007-0763-0.
12. Doyle, J.J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 19: 11-15.
13. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol*, 5: 1105-1109. doi: 10.1007/BF00037152.
14. Tsaia, L.C., Yub, Y.C., Hsiehc, H.M., Wanga, J.C., Linacred, A., Lee, J.C. (2006). Species identification using sequences of the *trnL* intron and the *trnL-trnF* IGS of chloroplast genome among popular plants in Taiwan. *Forensic Sci Int*, 164:193-200. doi: 10.1016/j.forsciint.2006.01.007.
15. Brezná, B., Hudecova, L., Kuchta, T. (2006). Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR). *Eur Food Res Technol*, 222: 600-603. doi: 10.1007/s00217-005-0168-x.
16. Krahulcová, J., Pangallo, D., Píknová, L., Siekel, P., Kuchta, T. (2003). Polymerase chain reaction for the detection of *Phaseolus vulgaris* beans in chestnut purée. *Eur Food Res Technol*, 217: 80-82. doi: 10.1007/s00217-003-0703-6.
17. Brüning, P., Haase, I., Matissek, R., Fischer, M. (2011). Marzipan: polymerase chain reaction-driven methods for authenticity control. *J Agric Food Chem*, 59: 11910-11917. doi: 10.1021/jf202484a.

## TOTAL PHENOLIC, FLAVONOID, TANNIN CONTENTS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *PLEUROTUS OSTREATUS* AND *PLEUROTUS CITRINOPILEATUS* CULTIVATED ON VARIOUS SAWDUST

Sibel Yıldız<sup>\*1</sup>, Ayşenur Yılmaz<sup>1</sup>, Zehra Can<sup>2</sup>, Ceyhan Kılıç<sup>3</sup>, Ümit Cafer Yıldız<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Forestry, Karadeniz Technical University, Turkey

<sup>2</sup>Şebinkarahisar Technical Sciences Vocational School, Giresun University, Turkey

<sup>3</sup>Eastern Black Sea Forestry Research Institute, Turkey

Geliş / Received: 14.11.2016; Kabul / Accepted: 25.01.2017; Online baskı / Published online: 17.03.2017

Yıldız, S., Yılmaz, A., Can, Z., Kılıç, C., Yıldız, Ü. C. (2017). Total phenolic, flavonoid, tannin contents and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus citrinopileatus* cultivated on various sawdust. *GIDA* (2017) 42 (3): 315-323 doi: 10.15237/gida.GD16099

### Abstract

In this study, the possibility of using of chestnut (*Castanea sativa*) sawdust in Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus citrinopileatus*) cultivation was investigated. Additionally; *Pleurotus ostreatus* cultivation on the substrates which was mixed of chestnut with black poplar (*Populus nigra*) and oriental spruce (*Picea orientalis*) was performed. Bioactive properties of these mushroom and their growth mediums were also examined. After a successful harvest, total phenolic, flavonoid, condensed tannin contents and antioxidant properties of mushrooms' methanolic extracts were determined. Same analyses were also performed for mushrooms substrates. The highest yield and biological efficiency was observed in *P. ostreatus* cultivated on 100% *Castanea sativa* substrate. The highest total phenolic content (2.529±0.010 mg GAE/g) was found in *P. citrinopileatus* cultivated on *C. sativa* sawdust and its substrate medium. Total flavonoid could not determine any mushroom. The highest total condensed tannin (3.691±0.011 CE mg/g) content was observed in *P. ostreatus* cultivated on *C. sativa* sawdust and its substrate medium; the highest ferric reducing antioxidant power (11.761±0.020 µmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/g) was seen in *P. ostreatus* mushroom cultivated on 50% *P. orientalis* + 50% *C. sativa* and 100% *C. sativa* substrate medium. The highest free radical scavenging activity of DPPH was in *P. citrinopileatus* and 100% *C. sativa* sawdust and 100% *C. sativa* substrate medium.

**Keywords:** Antioxidant, chestnut, *Pleurotus*, tannin content, total phenolic content

## ÇEŞİTLİ TALAŞLARDA ÜRETİLEN *PLEUROTUS OSTREATUS* VE *PLEUROTUS CITRINOPILEATUS* MANTARLARININ TOPLAM FENOLİK, FLAVONOİD VE TANEN İÇERİKLERİ VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİ

### Öz

Bu çalışmada *Pleurotus ostreatus* ve *Pleurotus citrinopileatus*'un (İstiridy mantarı/Kayın mantarı) kestane (*Castanea sativa*) odunu talaşındaki üretim olanakları üzerinde durulmuştur. Ayrıca; kestane talaşının; karakavak (*Populus nigra*) ve doğu ladini (*Picea orientalis*) talaşları ile karıştırıldığı ortamlarda *Pleurotus ostreatus* üretimi denenmiştir. Üretimlerin ardından elde edilen mantarların ve yetiştirme ortamlarının biyoaktif özellikleri araştırılmıştır. Başarılı bir hasat periyodundan sonra mantarların metanolik ekstraktları üzerinden toplam fenolik, flavonoid ve kondanse tanen içerikleri ve antioksidan özellikleri belirlenmiştir. Aynı deneyler mantar substratları için de tekrar edilmiştir. En yüksek verim ve biyolojik etkinlik değeri %100 *Castanea sativa* ortamında gelişen *P. ostreatus* mantarında gözlenmiştir. En yüksek fenolik içerik (2.529±0.010 mg GAE/g) *C. sativa* talaşında üretilen *P. citrinopileatus* mantarında ve kendi yetiştirme ortamında bulunmuştur. Hiç bir mantarda flavonoid içeriği tespit edilememiştir. En yüksek kondanse tanen içeriği (3.691±0.011 CE mg/g) %100 *C. sativa* talaşında üretilen *P. ostreatus*'da ve kendi yetiştirme substratında; en yüksek demir indirgeyici antioksidan aktivite (11.761±0.020 µmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/g) %50 *P. orientalis* + %50 *C. sativa* karışımında üretilen *P. ostreatus*'ta ve %100 *C. sativa* besin ortamında gözlenmiştir. En yüksek DPPH radikali temizleme aktivitesi %100 *C. sativa* ortamında üretilen *P. citrinopileatus* mantarında ve %100 *C. sativa* besin ortamında görülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, kestane, *Pleurotus*, tanen içeriği, toplam fenolik içerik

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ sibelyildizz@gmail.com,

☎ (+90) 462 377 1510,

☎ (+90) 462 325 7499

## INTRODUCTION

Under natural condition *Pleurotus* spp. is grown on living trees as parasite or dead woody branches of trees as primary decomposer and saprophyte (1). These species have extensive enzyme systems, so they are capable of utilizing lignocellulose-containing materials (2, 3). So, they can be cultivated on a wide variety of substrates containing lignin, cellulose and hemicellulose (4). In addition, cultivation of *Pleurotus* spp. can play an important role in managing lignocellulosic wastes (5).

Cultivation and consumption of mushrooms especially *Pleurotus* species' popularity have been increased day to day thanks to shorter cultivation time, medicinal and nutritional values and high yield potential of mushroom compared with *Agaricus* spp. (6-8). Mushrooms accumulate various secondary metabolites such as polyketides, phenolic compounds, steroids and terpenes (9). Many phenolic compounds have been reported to possess potent antioxidant activity and to have anticancer or anti-carcinogenic/anti-mutagenic, anti-atherosclerotic, anti-bacterial, anti-viral, and anti-inflammatory activities (10, 11). Some researchers have been noted that the bioactivity of phenolic may be related to their ability to inhibit lipoxygenase, chelate metals, and scavenge free radicals (12-14). Phenolic which present in mushrooms are known as natural antioxidants (15), so mushrooms have become more worth to researching. The composition of phenolic contents of mushrooms generally depends on genetic, environmental and other factors. The phenolic composition in mushrooms have been reported might be affected by a number of factors, namely mushroom strain/species, composition of growth media for in vitro cultured species, time of harvest, management techniques, handling conditions and preparation of the substrates for cultivated species and soil/substrate composition or host associated species in case of wild species either saprotrophic or mycorrhiza (16).

Most of natural compounds have a large number of biological activities involving antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, chemopreventive and cardioprotective effects (17). Chestnut wood (*Castanea sativa*) can be considered one of them. *Castanea sativa* is a tree belonging to the *Fagaceae* family, living in generally Mediterranean

regions of Europe. It is a good source in terms of phenolic bioactive compounds, especially in tannins (17, 18). Its leaves have been widely used, in folk medicine, for some diseases such as bronchitis, asthma, cough, cold, expectorating (17, 19). Its leaves were described as a source of natural antioxidants (19). Additionally; an extract obtained from *Castanea sativa* bark has been shown antiviral effect against various viruses (20). In another study; it was recorded that sweet chestnut wood extract reduced oxidative stress and prevented DNA damage in blood lymphocytes (21).

*Pleurotus* spp. can grow on many different substrates. In this case; the quality, yield and mineral composition of mushroom varies according to the chemical structure and nutritional content of substrate (22-25). To our knowledge there is limited data in the literature about bioactive properties of *Pleurotus* spp. especially growing on *Castanea sativa* wood which is particularly rich in tannin. In this study it was investigated *Pleurotus* species (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus citrinopileatus*) growing on *Castanea sativa* sawdust. Additionally; it was examined *Pleurotus ostreatus* growing on chestnut sawdust mixed with *Populus nigra* and *Picea orientalis* sawdust, separately. It was compared to the performance of *Pleurotus ostreatus* obtained from different substrates (100% *Castanea sativa* sawdust, 50% *Castanea sativa* sawdust + 50% *Populus nigra*, 50% *Castanea sativa* sawdust + 50% *Picea orientalis*) and performance of *Pleurotus citrinopileatus* obtained from 100% *Castanea sativa* sawdust in terms of yield, biological efficiency, total phenolic, flavonoids, condensed tannin contents and antioxidant properties. Same analyses were also performed for mushrooms substrates.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

*P. ostreatus* and *P. citrinopileatus* (Oyster mushroom) myceliums were obtained a commercial firm located in Istanbul. *Populus nigra*, *Picea orientalis* and *Castanea sativa* sawdust were supplied from plant of Forest Industry Engineering, Karadeniz Technical University, Trabzon.



### Substrate preparation and mushroom cultivation

Particle sizes of wood sawdust approximately were 2-3 cm, homogeneously. *Populus nigra* (Black poplar), *Picea orientalis* (Oriental spruce) and *Castanea sativa* (Chestnut) sawdust moistened with water until 70-80% and sterilized in an autoclave at 121°C for 1.5 h, the pH of each medium then were adjusted to pH 6.5–7.0 by addition varying amount of CaCO<sub>3</sub> (26). After cooling the substrates to 20°C, they were placed in nylon bags of 1 kg and inoculated by spreading spawn on the surface of the substrate with a weight percentage of about 3% (w/w) of the wet weight of compost. Substrate condition was carried out in four replications. Each nylon bags were inoculated in mushroom growing laboratory (at 15-25°C, 70-80% relative humidity). Harvesting was started in fifth week and the fruit bodies' stipe and cap was calculated and weighed. Mushrooms and their cultivation mediums are presented in Table 1. Unfortunately; compost mediums, consisting of chestnut sawdust mixed with *Populus nigra* and *Picea orientalis* sawdust, prepared for *Pleurotus citrinopileatus* cultivation were contaminated, despite repeated two times.

Table 1. Mushrooms and cultivation mediums

Mushroom species	Cultivation medium (sawdust)
<i>P. citrinopileatus</i>	100% <i>Castanea sativa</i>
<i>P. ostreatus</i>	100% <i>Castanea sativa</i>
<i>P. ostreatus</i>	50% <i>Castanea sativa</i> + 50% <i>Populus nigra</i>
<i>P. ostreatus</i>	50% <i>Castanea sativa</i> + 50% <i>Picea orientalis</i>
<i>P. citrinopileatus</i>	50% <i>Castanea sativa</i> + 50% <i>Populus nigra</i> *
<i>P. citrinopileatus</i>	50% <i>Castanea sativa</i> + 50% <i>Picea orientalis</i> *

\*: Contaminated variation

### Total yield and biological efficiency

Mushroom yield was calculated as total fresh weight of mushrooms obtained from 3 or 4 flushes in the harvest period (26). Biological efficiencies were defined as the percentage ratio of the fresh weight of harvested mushrooms over the dry weight of substrates (27).

### Preparation of the extract

Harvested mushrooms were sliced and dried in a food dryer 8 hours at 60 °C (Profilo, PFD1350W, Turkey). Dried mushroom was ground in a basic micro fine grinder and passed through 1

millimeter sieve (IKA, WERKE MF10, Germany). Approximately 5 g of powder samples in were placed into a falcon tube 50 mL 99% with additional methanol. The mixture was stirred continuously with a shaker (HeidolphPromax 2020, Schwabach, Germany) at room temperature for a total of 24 hours. Particles were removed using Whatman No. 4 filter paper pore size 20-25 µm. Then solutions were filtrated from hydrophilic polyvinylidene fluoride (PVDF) 0.45 µm for sterilization. The final volume of the solution was adjusted by the level of methanol.

### Determination of polyphenolic contents

The polyphenolic contents of the methanolic samples were evaluated three different ways; total phenolic contents (TPC), total flavonoids (TF) and total condensed tannin (TT). For the determination of the total phenolic contents, the Folin-Ciocalteu procedure was employed and gallic acid was used as standard (28). Shortly, 20 µL of various concentrations of gallic acid and samples, 400 µL of 0.5 N Folin-Ciocalteu reagent and 680 µL of distilled water were mixed and vortexed. After 3 min incubation, 400 µL of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10%) solution was added and vortexed. Then

the mixture was incubated for 2 h at 20 °C with interrupted shaking. Absorbance measurement was carried out at 760 nm at the end of the incubation period. A standard curve was prepared using gallic acid as a standard with different concentrations of gallic acid, and the results were expressed as mg (GAE) per g methanolic extracts.

The concentration of total flavonoid present in the methanolic extracts was measured using a spectrometric assay. Briefly, 0.5 mL samples, 0.1 mL of 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> and 0.1 mL of 1 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO were added to a test tube and incubated at room temperature for 40 min. Then the absorbance was measured against a blank at



415 nm. Quercetin was used for the standard calibration curve. The total flavonoid concentration was expressed as mg of quercetin equivalents per g sample (29)

Condensed tannins were determined according to the method by Julkunen-Titto(30). For each sample, various concentrations of 25 µL from extracts of plant were mixed with 750 µL of 4% vanillin (prepared with MeOH) and then 375 µL of concentrated HCl was added. The well-mixed solution was incubated at room temperature in darkness for 20 mins. The absorbance against the blank read at 500 nm. (+)-Catechin was used to help make the standard curve (0.05–1 mg/ml). The results were expressed as mg catechin equivalent to (CE)/g sample.

#### Determination of Antioxidant Capacity

The antioxidant capacity was determined using ferric reducing antioxidant power, free radical scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radicals (DPPH\*).

#### Ferric reducing antioxidant assay (FRAP)

FRAP assay was also tested to determine the total antioxidant capacity of the samples. This method is based on the reduction of tripyridyltriazine complex (Fe (TPTZ)<sup>3+</sup>) to blue colored Fe(TPTZ)<sup>2+</sup> by antioxidants in acidic medium (31). The preparation of working FRAP reagent was carried out by mixing 25 mL of 0.3 M acetate buffer pH 3.6 with 2.5 mL of 10 mM 2,4,6-tripyridylstriazine (TPTZ) solution in 40 mM HCl and 2.5 mL of 20 mM FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O solution. The reaction mixture consisting of 1mL of the sample and 3 mL of freshly prepared FRAP reagent was incubated at 37 °C for 4 min. Then, the absorbance was determined at 593 nm against blank prepared with distilled water. A calibration

curve prepared with an aqueous solution of ferrous sulfate FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O in the range of 100-1000 µM was used. Trolox was also tested under the same conditions as a standard antioxidant compound. FRAP values were expressed in wet weight of the samples as µmol of ferrous equivalent Fe (II) per g sample.

#### Scavenging of Free Radical (DPPH) Assay

The DPPH assay was applied using (32) to determine the radical scavenging capacity of the methanolic extracts of the mushroom. The simple method is based on scavenging the DPPH radicals with an antioxidant substance of the investigated solution. For each sample, six different concentrations of 0.75 mL of the extracts of the samples were mixed with 0.75 mL of 0.1 mM of DPPH in methanol, and the absorbance was read at 517 nm. The values were expressed as SC<sub>50</sub> (mg sample per mL), the concentration of the samples causing 50% scavenging DPPH radicals.

#### Statistical analysis

All assays were performed in triplicate. The data were recorded as means ± standard deviations and analyzed by using Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 23.0). The yield data obtained were analyzed by ANOVA and tests of significance were carried out using Duncan's multiple range tests.

## RESULTS AND DISCUSSION

#### Total yield and biological efficiency

Total yield and biological efficiency of cultivated mushroom on sawdust are presented in Table 2.

Table 2. Total yield (g/100g substrates) and biological efficiency (%) of cultivated mushroom

Material	Yield (g/100g substrates) X̄±SD	B.E.* (%) X̄±SD
100% <i>C. sativa</i> sawdust**	18.4±1.2 <sup>a</sup>	65.0±4.2 <sup>ab</sup>
100% <i>C. sativa</i> sawdust***	20.6±2.3 <sup>b</sup>	72.8±8.1 <sup>b</sup>
50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. nigra</i> sawdust***	19.7±1.8 <sup>ab</sup>	69.5±6.3 <sup>b</sup>
50 % <i>C.sativa</i> + 50% <i>P. orientalis</i> sawdust***	16.1±0.9 <sup>c</sup>	57.1±3.1 <sup>a</sup>

\*: Biological efficiency

\*\* : Values for *P. citrinopileatus* cultivation

\*\*\*: Values for *P. ostreatus* cultivation

<sup>a</sup> Means having the same superscript letter(s) are not significantly different ( $P>0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

After harvest period; the total yield (g/100g substrates) was calculated. 100% *Castanea sativa* sawdust used for *P. ostreatus* cultivation produced highest yield (20.6±2.3), whereas 50% *Castanea sativa* + 50% *Picea orientalis* sawdust produced the lowest (16.1±0.9) for the same mushroom. *Picea orientalis* additive had a negative effect on yield. This result can be attributed to the cultivation oyster mushroom on conifer wood substrates (pine, spruce, fir, etc). Such substrate types that have resins and other type of wood constituents can inhibit mycelium growth and colonization. Our results are comparable with other *P. ostreatus* cultivation studies (33, 34). Generally, total yield of different substrates was found significantly different ( $P<0.05$ ) each other by Duncan's multiple range test. Biological efficiency (%) ranged from 57.1±3.1 to 72.8±8.1 and is similar with literature data (35). According to the Samuel and Eugene (2012); differences in biological efficiencies of the various substrates were due to different substrate compositions (36).

### Polyphenolic contents

Total polyphenol (mg GAE/g), total flavonoid (mg QE/g) and condensed tannin (CE mg/g) contents of mushrooms and their own growth medium are presented in Table 3.

Phenolic compounds such as flavonoids, phenolic acids and tannins have been reported as natural antioxidants which commonly found in mushrooms with redox properties that act as reducing agents, hydrogen donors, free radical scavengers and singlet oxygen quenchers (15). In this study, *P. citrinopileatus* cultivated on 100% *C. sativa* sawdust exhibited the highest total phenolic content with 2.529±0.010 mg GAE/g and *P. ostreatus*

cultivated on 50% *C. sativa* + 50% *P. orientalis* sawdust was showed the lowest total phenolic content with 1.232±0.060 mg GAE/g. Our results are lower than some wild mushrooms' content (2.83-25.38mg GAE/g; (37, 38). Surprisingly; mushrooms have no detectable flavonoids, (Table 3). In the literature; total flavonoid content of *P. ostreatus* which grown on different substrates were ranged from 0.130±0.006 to 0.134±0.001 (mg QE/g) (39). In another study; total flavonoid content for *Pleurotus florida* was 0.17±0.02 (mg QE/g) and for *Flammulina velutipes* was 0.20±0.05 (mg QE/g) (40).

*P. ostreatus* and *P. citrinopileatus* cultivated on 100% *C. sativa* sawdust was produced the highest condensed tannin content (3.691±0.011 CE mg/g, 3.674±0.009, respectively). *P. ostreatus* cultivated on 50% *C. sativa* + 50% *P. nigra* sawdust was produced the lowest condensed tannin content with 0.618±0.062 CE mg/g. Our results were higher than cultivated *P. ostreatus* tannin content (0.32-1.44 CE mg/g) and higher than some wild mushrooms (*Lentinus ciliates*, *Hygrocybe conica*, *Schizophyllum commune*) tannin content (0.28-2.24 CE mg/g) (41), (Table 3). Generally, total phenolic content of mushrooms was found significantly different ( $P<0.05$ ) each other by Duncan's multiple range test. This difference can be related to different content of growth medium.

When examined the mushroom growth medium; the highest total polyphenol and total tannin contents were obtained from 100% *C. sativa* sawdust substrate. 50% *C. sativa* + 50% *P. orientalis* sawdust substrate produced the lowest total polyphenol and total tannin contents. But the same substrate also exhibited the highest flavonoid

Table 3. Total polyphenol (mg GAE/g), total flavonoid (mg QE/g) and condensed tannin (CE mg/g) contents of mushrooms and their own growth medium

Mushroom / Growth medium	Total Polyphenol (mg GAE/g) $\bar{X}\pm SD$	Total Flavonoid (mg QE/g) $\bar{X}\pm SD$	Condensed Tannin (CE mg/g) $\bar{X}\pm SD$
<i>P. citrinopileatus</i> cultivated on 100% <i>C. sativa</i> sawdust	2.529±0.010 <sup>a</sup>	-	3.674±0.009 <sup>a</sup>
<i>P. ostreatus</i> cultivated on 100% <i>C. sativa</i> sawdust	1.768±0.082 <sup>b</sup>	-	3.691±0.011 <sup>b</sup>
<i>P. ostreatus</i> cultivated on 50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. nigra</i> sawdust**	1.304±0.084 <sup>c</sup>	-	0.618±0.062 <sup>c</sup>
<i>P. ostreatus</i> cultivated on 50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. orientalis</i> sawdust	1.232±0.060 <sup>c</sup>	-	1.380±0.009 <sup>c</sup>
100% <i>C. sativa</i> sawdust	25.153±0.041 <sup>a</sup>	0.643±0.097 <sup>a</sup>	3.758±0.021 <sup>a</sup>
50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. nigra</i> sawdust	16.713±0.018 <sup>b</sup>	0.654±0.019 <sup>a</sup>	0.591±0.033 <sup>b</sup>
50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. orientalis</i> sawdust	13.374±0.152 <sup>c</sup>	0.782±0.016 <sup>b</sup>	0.140±0.028 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Means having the same superscript letter(s) are not significantly different ( $P>0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

content. The small amount of flavonoid detected in the growing mediums. Also, the total phenolic content and condensed tannin of mushrooms' growing mediums were found significantly different ( $P<0.05$ ) each other by Duncan's multiple range test.

The composition of phenolic contents of mushrooms generally depends on genetic, environmental and other factors. The phenolic composition in mushrooms might be affected by a number of factors, namely mushroom strain/species, composition of growth media for in vitro cultured species, time of harvest, management techniques, handling conditions, and preparation of the substrates for cultivated species (16).

### Antioxidant properties

The antioxidant activity of cultivated mushrooms and their own growth mediums are presented in Table 4.

(Table 4). This results are similar with *H. erinaceum* mushroom chloroform extract's value (10.66  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ , (43)) and lower than different sub fractions of methanol extracts of *Naematoloma sublateritium* (44.25-299.24  $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ , (44). Frap activities of mushroom and mushrooms' growth mediums extracts were found significantly different ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

*P. citrinopileatus* cultivated on 100% *C. sativa* sawdust produced the highest DPPH value with  $6.480 \pm 0.089$  mg/mL and *P. ostreatus* cultivated on mixed sawdust exhibited the lowest value with  $22.922 \pm 0.001$  mg/mL, (Table 4). Our values were lower in terms of antioxidant activity than some wild mushrooms *Leucopaxillus giganteus*, *Sarcodon imbricatus*, *Agaricus arvensis* (1.44-3.50 mg/mL; (38) and similarly other than some cultivated mushrooms such as *Agaricus bisporus* and *Agaricus brasiliensis* (1.67-4.57 mg/mL, respectively; (45)). Generally, DPPH activities of

Table 4. The antioxidant activity of cultivated mushrooms and their own growth mediums

Material	FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ ) $\bar{X} \pm \text{SD}$	DPPH-SC <sub>50</sub> (mg/mL) $\bar{X} \pm \text{SD}$
<i>P. citrinopileatus</i> cultivated on 100% <i>C. sativa</i> sawdust	$10.130 \pm 0.165^a$	$6.480 \pm 0.089^a$
<i>P. ostreatus</i> cultivated on 100% <i>C. sativa</i> sawdust	$5.580 \pm 0.189^b$	$19.167 \pm 0.051^b$
<i>P. ostreatus</i> cultivated on 50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. nigra</i> sawdust	$5.929 \pm 0.051^c$	$22.922 \pm 0.002^c$
<i>P. ostreatus</i> cultivated on 50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. orientalis</i> sawdust	$11.761 \pm 0.020^d$	$22.922 \pm 0.001^c$
100% <i>C. sativa</i> sawdust	$733.200 \pm 0.121^a$	$0.048 \pm 0.001^a$
50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. nigra</i> sawdust	$287.408 \pm 0.043^b$	$0.109 \pm 0.003^b$
50% <i>C. sativa</i> + 50% <i>P. orientalis</i> sawdust	$270.550 \pm 0.098^c$	$0.144 \pm 0.001^c$

<sup>a</sup> Means having the same superscript letter(s) are not significantly different ( $P>0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

The antioxidants are possible protective agents to helping the human bodies in decrease oxidative destruction (42). In this study, antioxidant capacity was determined using ferric reducing antioxidant power (FRAP), free radical scavenging activity of DPPH. FRAP refers to the antioxidant effect exerted by the donation of a hydrogen atom and subsequent breakage of the free radical chain (43).

The highest ferric reducing antioxidant power ( $11.761 \pm 0.020$   $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ ) was determined in *P. ostreatus* cultivated on 50% *C. sativa* + 50% *P. orientalis* sawdust extract. The lowest one ( $5.580 \pm 0.189$   $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$ ) was seen in *P. ostreatus* cultivated on 100% *C. sativa* sawdust,

mushroom and mushrooms' growth mediums extracts were found significantly different ( $P<0.05$ ) by Duncan's multiple range test, too.

### CONCLUSION

In this study, the possibility of using of chestnut (*Castanea sativa*) sawdust in *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus citrinopileatus* cultivation was investigated. Additionally; *Pleurotus ostreatus* cultivation on the substrates which was mixed of chestnut with *Populus nigra* and *Picea orientalis* was performed. Bioactive properties of these mushroom and their growth mediums were also examined.

100% *Castanea sativa* sawdust which used for *P. ostreatus* cultivation produced highest yield ( $20.6 \pm 2.3$  g/100g) and biological efficiency (72.8%) whereas 50% *Castanea sativa* + 50% *Picea orientalis* variation produced the lowest ( $16.1 \pm 0.9$  g/100g) for the same mushroom. *Picea orientalis* additive had a negative effect on yield probably due to the resins and other phenolic components present in conifer wood substrate which can inhibit mycelium growth. *P. citrinopileatus* cultivated on 100% *C. sativa* sawdust exhibited the highest total phenolic content with  $2.529 \pm 0.010$  mg GAE/g, in parallel to the growth medium. Total flavonoid could not determine any mushroom species. *P. ostreatus* and *P. citrinopileatus* cultivated on 100% *C. sativa* sawdust was produced the highest condensed tannin content correspondingly the growth medium. Since the tannin is widely found in chestnut wood, this result is not surprising. In the same substrate medium (100% *C. sativa* sawdust) the antioxidant activity of *P. citrinopileatus* was found two times higher than that of *P. ostreatus*. The highest ferric reducing antioxidant capacities (FRAP)  $11.761 \pm 0.020$   $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g}$  was determined in *P. ostreatus* cultivated on 50% *C. sativa* + 50% *P. orientalis* sawdust at the same time *P. citrinopileatus* cultivated on 100% *C. sativa* sawdust FRAP values was found to be  $10.130 \pm 0.165$ . *P. citrinopileatus* cultivated on 100 % *C. sativa* sawdust produced the highest DPPH value with  $6.480 \pm 0.089$  mg/ mL. Consequently; *C. sativa* and the other sawdust types were generally showed good results in terms of studied various bioactive analyses. Different *Castanea* wood species can be performed with more efficient extraction methodologies and different mushroom species.

#### Acknowledgement

This study was presented in 4th International Conference on Processing Technologies for the Forest and Bio-based Industries (PTF BPI 2016) as abstract paper.

#### REFERENCES

1. Bhatti M, Jiskani M, Wagan K, Pathan M, Magsi M. 2007. Growth, development and yield of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex. Fr.) Kummer as affected by different spawn rates. *Pak J Bot*, 39, 2685-2692.
2. Yalinkilic M, Altun L, Baysal E, Demirci Z. 1994. Development of mushroom cultivation techniques in Eastern Black Sea Region of Turkey. *Project of The Scientific and Technical Research Council of Turkey (TUBITAK)*, No. TOAG, 985:377.
3. Garcha H, Dhanda S, Khanna P. 1984. Evaluation of various organic residues for the cultivation of *Pleurotus* (Dhingri) species. *Mush Newslett Trop*, 5, 13-16.
4. Gregori A, Svagelj M, Pohleven J. 2007. Cultivation techniques and medicinal properties of *Pleurotus* spp. *Food Technol Biotechnol*, 45, 238-249.
5. Das N, Mukherjee M. 2007. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants *Bioresource Technol*, 98, 2723-2726.
6. Zadrazil F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*. In: *The Biology and Cultivation of Edible Mushrooms*, Academic Press, New York, pp. 521-557.
7. Khanna P, Garcha H. 1984. *Pleurotus* mushroom-A source of food protein. *Mushroom News Lett Tropics*, 4, 9-14.
8. Upadhyay RC, Singh M. 2011. Production of edible mushrooms. In: *Industrial Applications*. Springer, pp. 79-97.
9. Turkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chem*, 101, 267-273.
10. Attarat J, Phermthai T. 2014. Bioactive compounds in three edible *Lentinus* mushrooms. *Walailak J Sci Technol*, 12, 491-504.
11. Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chem*, 80, 29-33.

12. Smith JE, Rowan N, Sullivan R. 2002. Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. [http://www.academia.edu/305933/Medicinal\\_Mushrooms\\_Their\\_therapeutic\\_properties\\_and\\_current\\_medical\\_usage\\_with\\_special\\_emphasis\\_on\\_cancer\\_treatments](http://www.academia.edu/305933/Medicinal_Mushrooms_Their_therapeutic_properties_and_current_medical_usage_with_special_emphasis_on_cancer_treatments) (Accessed 6 October 2016).
13. Tapiero H, Tew K, Ba G N, Mathe G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother*, 56, 200-207.
14. Decker EA. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants?. *Nutr Rev*, 55, 396-398.
15. Barros L, Calhella RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, Estevinho LM. 2006. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur Food Res Technol*, 225, 151-156.
16. Heleno SA, Barros L, Sousa MJ, Martins A, Ferreira IC. 2010. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chem*, 119, 1443-1450.
17. Chiarini A, Micucci M, Malaguti M, Budriesi R, Ioan P, Lenzi M, Fimognari C, Gallina T, Tullia C, Patrizia, H Silvana. 2013. Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) bark extract: cardiovascular activity and myocyte protection against oxidative damage. *Oxidative Med Cell Longevity*, 2013, 1-10.
18. Sanz M, Cadahia E, Esteruelas E, Muñoz AM, Fernández de Simón B, Hernández T, Estrella I. 2010. Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *J Agric Food Chem*, 58, 9631-9640.
19. Calliste C-A, Trouillas P, Allais D-P, Duroux J-L. 2005. *Castanea sativa* Mill. leaves as new sources of natural antioxidant: an electronic spin resonance study. *J Agric Food Chem*, 53, 282-288.
20. Lupini C, Cecchinato M, Scagliarini A, Graziani R, Catelli E. 2009. In vitro antiviral activity of chestnut and quebracho woods extracts against avian reovirus and metapneumovirus. *Res Vet Sci*, 87, 482-487.
21. Frankic T, Salobir J. 2011. In vivo antioxidant potential of Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract in young growing pigs exposed to n 3 PUFA induced oxidative stress. *J Sci Food Agr*, 91, 1432-1439.
22. Hoa HT, Wang C-L, Wang C-H. 2015. The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43, 423-434.
23. Badu M, Twumasi SK, Boadi NO. 2011. Effects of lignocellulosic in wood used as substrate on the quality and yield of mushrooms. *Food Nutr Sci*, 2, 780-784.
24. Patil SS, Ahmed SA, Telang SM, Baig MMV. 2010. The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm cultivated on different lignocellulosic agro-wastes. *Innovative Rom Food Biotechnol*, 7, 66-76.
25. Peksen A, Yakupoglu G. 2009. Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World J Microb Biot*, 25, 611-618.
26. Royse DJ. 1985. Effect of spawn run time and substrate nutrition on yield and size of the shiitake mushroom. *Mycologia*, 756-762.
27. Chang S, Lau O, Cho K. 1981. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. *Eur J Appl Microbiol*, 12, 58-62.
28. Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult*, 28, 49-55.
29. Fukumoto L, Mazza G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds *J Agr Food Chem*, 48, 3597-3604.
30. Julkunen-Tiitto R. 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *J Agr Food Chem*, 33, 213-217.
31. Benzie IF, Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239, 70-76.
32. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*, 26, 211-219.
33. Yıldız A, Karakaplan M, Aydın F. 1998. Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. var. *salignus* (Pers. ex Fr.) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores. *Food Chem*, 61, 127-130.

34. Dündar A, Yildiz A. 2009. A comparative study on *Pleurotus ostreatus* (jacq.) P. kumm. cultivated on different agricultural lignocellulosic wastes. *Turk J Biol*, 33,171-179.
35. Obodai M, Cleland-Okine J, Vowotor K. 2003. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30, 146-149.
36. Samuel AA, Eugene TL. 2012. Growth performance and yield of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on different substrates composition in buea south west cameroon. *Sci J Biochem*, 2012, 1-6.
37. Gursoy N, Sarikurkcu C, Cengiz M, Solak MH. 2009. Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven *Morchella* species. *Food Chem Toxicol*, 47, 2381-2388.
38. Barros L, Ferreira M-J, Queirós B, Ferreira ICFR, Baptista P. 2007. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem*, 103, 413-419.
39. Yılmaz A, Yıldız S, Kılıç C, Can Z. 2017. Total phenolics, flavonoids, tannin contents and antioxidant properties of *Pleurotusostreatus* cultivated on different wastes and sawdust. *Int J Second Metabolite*, 4, 1-9.
40. Wong F-C, Chai T-T, Tan S-L, Yong A-L. 2013. Evaluation of bioactivities and phenolic content of selected edible mushrooms in Malaysia, *Tropic J Pharm Res*, 12, 1011-1016.
41. SengYim H, YeeChye F, KhengHo S, WaiHo C. 2009. Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *Asian J Food Agro-Industry*, 2, 392-401.
42. Turkoglu A, Kivrak I, Mercan N, Duru M, Gezer K, Turkoglu H. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. *Afr J Biotechnol*, 5, 1146-1150.
43. Li H, Park S, Moon B, Yoo Y-B, Lee Y-W, Lee C. 2012. Targeted phenolic analysis in *Herichium erinaceum* and its antioxidant activities. *Food Sci Biotechnol*, 21, 881-888.
44. Li H, Nam W-S, Moon B, Lee C. 2014. Antioxidant activity and phenolic content of brick caps mycelium (*Naematoloma sublateritium*) extracts. *Food Sci Biotechnol*, 23, 1425-1431.
45. Gan C, Nurul Amira B, Asmah R. 2013. Antioxidant analysis of different types of edible mushrooms (*Agaricus bisporous* and *Agaricus brasiliensis*). *Int Food Res J*, 20, 1095-1102.

## CONTENT OF PROTEIN AND ORTHO-DIHYDRIC PHENOL IN *AGARICUS BISPORUS* X25 CULTIVATED ON DECOMPOSED AGROSUBSTRATES

Mustafa Nadhim Owaid<sup>1,2\*</sup>, Mowafaq Mezban Muslat<sup>3</sup>, Idham Ali Abed<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Heet Education, General Directorate of Education in Anbar, Ministry of Education, Heet, Anbar, Iraq

<sup>2</sup>Department of Biology, College of Science, University of Anbar, Ramadi, Anbar, Iraq

<sup>3</sup>Department of Horticulture, College of Agriculture, University of Anbar, Ramadi, Anbar, Iraq

<sup>4</sup>Department of Soil Science and Water Resources, College of Agriculture, University of Anbar, Ramadi, Anbar, Iraq

Geliş / Received: 21.10.2016; Kabul / Accepted: 26.03.2017; Online baskı / Published online: 21.03.2017

Owaid, M.N., Muslat, M.M., Abed, I.A. (2017). Content of protein and ortho-dihydric phenol in *Agaricus bisporus* X25 cultivated on decomposed agrosubstrates. *GIDA* (2017) 42 (3): 324-328 doi: 10.15237/gida.GD16093

### Abstract

This study investigates the nutritional value of white button mushroom *Agaricus bisporus* X25 which cultivated on six composts viz., wheat straw compost, reed (*Phragmites australis*) straw compost and the mixture (1:1) (wheat straw and reed straw) which decomposed with or without adding bacterial inoculum *Streptomyces* during substrates composting. In general, using bacterial inoculum raised values of proteins and ortho-dihydric phenol in fruiting bodies of *A. bisporus* X25, while the mixture compost raised protein content and reed compost raised ortho-dihydric phenol of fruiting bodies of *A. bisporus*. Thus, this mushroom strain has considered amounts of proteins and phenols.

**Keywords:** Compost, nutritional value, pharmaceutical value, *Phragmites australis*, *Streptomyces*.

## FARKLI KOMPOSTLARDA ÜRETİLEN *AGARICUS BISPORUS* X25 MANTARLARININ PROTEİN VE ORTO-DİHİDRİK FENOL İÇERİKLERİ

### Öz

Bu çalışmada *Streptomyces* kültürü kullanılarak veya kullanılmaksızın hazırlanmış beyaz buğday samanı, kamış samanı (*Phragmites australis*) ve bu ikisinin 1:1'lik karışımı olmak üzere altı farklı kompostta üretilen beyaz düğme mantarlarının (*Agaricus bisporus* X25) besleyici değeri incelenmiştir. Genel olarak bakteriyel aşılama işlemi *A. bisporus* X25 mantarlarının protein ve orto-dihidrik fenol içeriğini artırmıştır. Karışım kompost ve kamış kompost kullanımı *A. bisporus* mantarlarında sırasıyla protein ve orto-dihidrik fenol içeriğini artırmıştır. Sonuçta bu mantar türünün protein ve fenolik bileşikler açısından değeri ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Kompost, besleyici değer, farmasötik değer, *Phragmites australis*, *Streptomyces*.

\* Corresponding author/ Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉ mustafanowaid@gmail.com, ☎ (+96) 479 0265 1440



## INTRODUCTION

The edible mushroom *Agaricus bisporus* belongs to *Basidiomycota* and it is called white button mushroom as a common name (1). Medicinally, *Agaricus bisporus* X25 has antioxidant activity (2) because of its content of phenols and ergothioneine (3). It has a high nutritional value due to its high amino acids/proteins content especially (4, 5). It has a high ability to bio-convert lignocelluloses matters to fresh edible mushroom, such as using composted wheat straw, common reed, sesaban plant and sunflower head for *A. bisporus* cultivation (4, 6, 7), whereas sawdust with wheat straw was used for its production globally (8). These composts supplemented with licorice extract and decomposed using the bacteria that led to increasing their proteins content (6, 9).

*Agaricus bisporus* has a lowest heavy metal concentrations K, Na, Co, Pb, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Mn (3,5), P, K, S, Ca and Li, without starch and rich of essential vitamins A, B, C and D (10), that lead to encourage peoples for consuming healthy food. This mushroom was found to be good sources of microelements. Also, it has essential amino acids (4) and active compounds to decrease cholesterol of blood serum; therefore, it is a benefit to treating atherosclerosis and diabetes mellitus. It has low calories gain that useful for treatment the obesity (11). *A. bisporus* X25 has trace mineral elements such as Pb, Cd and Cr at concentrations 7.5-8.0, 0.2-0.3 and 24.6-14.1 mg/Kg respectively based on dry matter, but these levels were below the safety limits defined by FAO/WHO for weekly Required Dietary Intake (RDI) (5).

Fruiting bodies which produced on commercial substrates are non-economic because of the high price of substrate especially wheat straw substrate. Thus must determining the nutritional value of mushroom which cultivated on local composts have low prices and available during the year from a side and to decrease the pollutions outcome from burning it from another side. However, no reference is found in the literature regarding the comparison of determining the nutritional value of *A. bisporus* fruiting bodies cultivated on local composts. Thus, the objective of this study is calculating the nutritional value of *A. bisporus* harvested from six composts containing wheat straw and reed straw.

## MATERIALS AND METHODS

### Mushroom samples

Fruiting bodies of white button mushroom *Agaricus bisporus* X25 obtained from Iraqi local farm related with the University of Anbar. Fruiting bodies which harvested from six composts containing wheat (*Triticum sativum*) straw, reed (*Phragmites australis*) straw and their mixture 1:1 with or without *Streptomyces* inoculum treatment during the composting process. Six treatments were used in this test including: wheat straw compost, reed straw compost, the mixture compost (1:1), the decomposed wheat straw compost using *Streptomyces* sp., the decomposed reed straw compost using *Streptomyces* sp., and the decomposed mixture compost using *Streptomyces* sp. Solid state fermentation was achieved outdoor and indoor during phase 1 and phase 2 respectively as mentioned by Muslat et al. (6). After pasteurization of compost and cooling, mushroom spawn was applied within bed at percent 2% based on dry weight using Ruffling Method until mycelial growth completion.

### Protein determination using Kjeldahl method

The nitrogen content in fruiting bodies of *Agaricus bisporus* X25 was determined using Kjeldahl method by Gallenkamp Kjeldahl Apparatus in Plant Tissues Lab., Department of Biology, College of Science, University of Anbar. Protein content was calculated using this equation:  $\text{Protein\%} = \text{Nitrogen content} \times 6.25 \times 100$  (12).

### Ortho-dihydric phenol determination using Arnov's method

In a water bath, one gram of fresh fruiting bodies extracted within 5-10 ml 80% Ethyl alcohol for 5-10 min. After cooling the samples, the mixture crushed in a porcelain mortar, then filtrated using filter paper Whatman No. 1. The residue was re-extracted again within 3 ml of Ethyl alcohol for 2-3 min and filtrated, then completed the volume to 10 ml using 80% Ethyl alcohol. The reagent was prepared by dissolution 10 g of Sodium Nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) and 10 g of Sodium Molybdate ( $\text{NaMoO}_4$ ) and then completed to volume 100ml using Distilled water (D.W). The reagent was stored in dark bottles until use. Add

one ml from each extracted alcohol solution, (0.5 N) HCl and the reagent within 10 ml of D.W then intermix the intermixture with 2 ml (1 N) NaOH. After mixing the mixture with NaOH, the color of intermixture changed to pink color. Read at 515 nm using Spectrophotometer and the result calculated using stander curve of ortho-dihydric phenols (1.88-16.92) g/L (13).

### Statistical Analysis

The experimental data were subjected to an analysis of variance by two ways analysis (ANOVA) using GenStat Discovery Edition computer program version 7 DE3 (VSN International Ltd., UK) to determine the least significant difference among means at the level least of 0.05 ( $P < 0.05$ ). Three replicates were examined in the experiments.

## RESULTS AND DISCUSSION

The chemical analysis of six fruiting bodies of *Agaricus bisporus* X25 was observed in Table 1. Protein percentage was defined based on the dry mushroom. The higher protein percentage was 21.85% achieved using basidiocarps which cultivated on mixture compost with treatment by *Streptomyces* inoculum, significantly ( $P < 0.05$ ), followed 19.51% by fruits of wheat straw and mixture composts with and without treatment. Basidiocarps which harvested from reed straw compost with treatment recorded protein content 18.09%. The lower protein percentage was 16.38% for fruits of reed straw compost without treatment compared with 17.02% by basidiocarps cultivated on wheat straw compost (control).

The content of ortho-dihydric phenols was determined on the fresh mushroom basis (Table 1). The higher ortho-dihydric phenols content was

10.45 g/L achieved on basidiocarps of reed straw compost with treatment by bacterial inoculum significantly ( $P < 0.05$ ), followed 9.04% by fruits of same compost without treatment. Basidiocarps of the mixture compost with treatment, wheat straw (control) and reed straw composts without treatment recorded ortho-dihydric phenols content 8.97, 8.91 and 8.90 g/L, respectively. The lower ortho-dihydric phenols content was 8.60 g/L for fruits of reed straw compost with treatment.

From another side, fruiting bodies of *Agaricus bisporus* X25 which cultivated on the mixture compost 1:1 (wheat straw: reed straw) observed higher protein percentage 20.68% significantly ( $P < 0.05$ ). However, the control treatment (fruits from wheat straw compost) recorded percentage 18.26% followed 17.23% for the fruits from reed straw compost which was poor in protein level compared with others. That is because of low content of nitrogen (amino acids) in reed straw compost which had higher C:N ratio (1:22) than the mixture (1:20) and control (1:10) composts, thus must use the mixture compost to improve quality of these composts (14).

Also, the reason of low protein content in *A. bisporus* X25 fruits which harvested from reed straw compost may be related to high lignin content in this medium in comparison to cellulose and hemicellulose in wheat straw and mixture composts. Indeed, lignin of reed plant slower decomposition than cellulose and hemicellulose (15). The mixture compost observed high protein content for basidiocarps of *A. bisporus* X25 because of various and increasing soil microbes which had good growth in the aerobic condition in solid substrate fermentation (6).

Muslat et al., (6) mentioned that i ncreasing temperatures of the mixture compost during composting processes help to improve C:N ratio

Table 1 Nutritional content of fruiting bodies of *A. bisporus* X25

Fruiting bodies	Wheat straw	Reed wastes	Mixture 1:1	LSD ( $P < 0.05$ )
Protein percentage based on dry mushroom				
Without treatment	17.02	16.38	19.51	0.450
Treated with <i>Streptomyces</i>	19.51	18.09	21.85	
Decomposed substrates Ortho-dihydric phenols (g/L) based on fresh mushroom				
Without treatment	8.91	9.04	8.90	0.420
Treated with <i>Streptomyces</i>	8.60	10.45	8.97	

Legend: Average of moisture content of fruiting bodies about 89%-90%.

to an optimal condition for white button mushroom (*A. bisporus*) cultivation. In solid substrate fermentation, using *Streptomyces* inoculum during composting processes also lead to increase protein content in compost because of the high biomass of lysed soil bacteria and fungi. That agrees with Benimelia et al., (16) who referred to increase amino acids and enzymes in compost from the outcome of lysed bacteria/microbes, thus, the growth of soil microbes in compost guides to concentrate nitrogen and minerals sources to support mushroom cultivation (17).

From another side, the content of ortho-dihydric phenols differed according to type of cellulosic waste used as a media for cultivation. The higher significant ( $P < 0.05$ ) ortho-dihydric phenols was 9.74 g/L (basis on fresh weight) for cultivated *A. bisporus* X25 on reed straw compost, followed 8.93 and 8.75 g/L for fruits of the mixture and wheat straw composts, respectively.

Indeed, *A. bisporus* is useful enzymatic source such as Laccase which oxidizes phenolic compounds (18). That demonstrates reason of low ortho-dihydric phenol content in some samples. Also, *A. bisporus* has a hydrolytic system (oxidization factors) to consume carbohydrates, and lignolytic system to decomposed lignocellulosic matters and phenol rings (19).

The high ortho-dihydric phenols in fruiting bodies of reed straw compost may be returned to inhibit polyphenol oxidase because of the high lignin content in this compost (18). Although, fruits of reed straw compost had higher ortho-dihydric phenol content (Table 2) but this finding near from control (fruits which harvested from wheat straw compost). That agrees with Al-Kiasy (20) who referred to ortho-dihydric phenol content 9.39 g/L with fruiting bodies of *A. bisporus* harvested from wheat straw compost. That is important to inhibit pathogenic microbes because of its antioxidant and antimicrobial activity (21).

## CONCLUSION

This study was investigated the nutritional value of white button mushroom *Agaricus bisporus* X25 harvested from six composts viz., wheat straw compost, reed (*Phragmites australis*) straw compost and the mixture compost (1:1) were treated with or without bacteria inoculum

(*Streptomyces*) during the composting process. The mixture compost which decomposed using bacterium *Streptomyces* has the best protein content (21.85%) significantly ( $P < 0.0$ ). The higher content of ortho-dihydric phenols was 10.45 g/L with fruits of reed straw compost without treatment.

## REFERENCES

1. Chang, S-T, Miles, PG. 2004. Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Enviromental Impact, 2nd Ed. CRC Press LLC. USA. pp. 451.
2. Kozarski, M, Klaus, A, Niksic, M, Jakovljevic, D, Helsper, JPF, Van Griensven, LJLD. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phebellinus linteus*. *Food Chem*, 129, 1667-1675.
3. Ghahremani-Majid, H, Dashti F. 2015. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56(3), 376-382.
4. Muslat, MM, Al-Assaffii, IAA, Owaid, MN. 2014. *Agaricus bisporus* product development by using local substrate with bio-amendment. *Int J Environ Global Clim*, 2(4), 176-188.
5. Owaid, MN. 2015. Mineral elements content in two sources of *Agaricus bisporus* in Iraqi market. *J Adv Appl Sci*, 3(2), 46-50.
6. Muslat, MM, Al-Assaffii, IAA, Alheeti, MNO. 2011. Use Efficiency of Reed Residues *Phragmites australis* with Amendment by *Streptomyces* O3 to Prepared Compost for *Agaricus bisporus* Production and Influence of Spraying *Glycyrrhiza* sp. extracts. *Res J Aleppo Uni . Agri Sci Seri*, 93, 149-168.
7. Rasheed, HM, Abed, IA. 2013. Recycling of wastes from cities and fields by preparing a substrate for mushroom *Agaricus bisporus* production. *Int J Enviro Global Clim Chan*, 1(1), 62-71.
8. Schmidt, O. 2006. Wood and Tree Fungi, Biology, Damage, Protection and Use. Springer. Germany. p. 334.

9. Muslat, MM, Alheeti, MN, Al-Assaffii, IA. 2010. Study the effect of different concentrations of aqueous extract of liquorices on the speed of the mycelial growth of *Agaricus bisporus*, Biomass and Protein Content. *Al-Anbar J Agri Sci*, 8(4), 223-229.
10. Akbarirad, H, Kazemeini, SM, Shariaty, MA. 2013. Deterioration and some of applied preservation techniques for common mushrooms (*Agaricus bisporus*, followed by *Lentinus edodes*, *Pleurotus* spp.). *J Microbio Biotech and Food Sci*, 2(6), 2398-2402.
11. Halpern, G M. 2006. Healing Mushrooms. Squareone Publishers. USA. p.182.
12. Colak, M, Baysal, E, Simsek, H, Toker, H, Yilmaz, F. 2007. Cultivation of *Agaricus bisporus* on Wheat Straw and Waste Tea Leaves Based Composts and Locally Available Casing Materials Part 3: Dry Matter, Protein and Carbohydrate Contents of *Agaricus bisporus*. *Afr J Biotechnol*, 6(24), 2855-2859.
13. Mahadevan, A, Sridhar, R. 1986. Methods in Physiological Plant Pathology, 3rd ed. Sivakami Publications Indira Nagar, Madra.
14. Alheeti, MN, Al-Assaffii, IA, Muslat, MM. 2010. Evaluation the efficiency of reed plant (*Phragmites australis*) wastes and aqueous extract of Liquorices (*Glycyrrhiza glabra*) on the production of *Agaricus bisporus*. *J Uni Anbar Pure Sci*, 4(2), 13-21.
15. Edit, A-S, Dinka, M, Nemedi, L, Horvath, G. 2006. Decomposition of *Phragmites australis* rhizome in a Shallow Lake. *Aquatic Botany*, 85, 309-316.
16. Benimelia, CS, Castroa, GR, Chailec, AP, Amoroso, MJ. 2007. Lindane Uptake and Degradation by Aquatic *Streptomyces* sp. Strain M7. *Int. Biodeterior Biodegrad*, 59, 148-155.
17. Savoie, J-M. 1998. Changes in Enzyme Activities during Early Growth of the Edible Mushroom, *Agaricus bisporus*, in Compost. *Mycol Res*, 102(9), 1113-1118.
18. Hou, H, Zhou, J, Wang, J, Du, C, Yan, B. 2004. Enhancement of Laccase Production by *Pleurotus ostreatus* and Its Use for the Decolorization of Antraquinone Dye. *Proc Biochem*, 39,1415-1419.
19. Sanchez, C. 2009. Lignocellulosic Residues Biodegradation and Bioconversion by Fungi. Elsevier Inc. *Biotech Adv*, 27, 185-194.
20. Al-Kiasy, MRM. 2006. Evaluation the efficiency of some additive materials to the compost on the productivity and storability of white button mushroom. College of Agriculture, University of Baghdad, Iraq.
21. Kumar V S, Sathishkumar G, Sivaramakrishnan, S, Sujatha, K, Razia M. 2016. Evaluation of Phytoconstituents, *In Vitro* antioxidant and antimicrobial activities of edible white button mushroom *Agaricus bisporus*. *Int J Pharm Pharm Sci*, 8(3), 67-71.

## **VALORIZATION OF OLIVE-OIL INDUSTRY SOLID WASTE: STATISTICAL OPTIMIZATION OF ALKALINE EXTRACTION CONDITIONS FOR LIGHT-COLOURED HEMICELLULOSES**

**Didem Sutay Kocabaş\*, Eren Yurtdaş, Ayşe Nur Demir**

Department of Food Engineering, Karamanoğlu Mehmetbey University, Karaman, Turkey

Received/ Geliş: 14.11.2016; Accepted / Kabul: 06.03.2017; Online baskı / Published online: 23.03.2017

Sutay Kocabaş, D, Yurtdaş, E, Demir, AN, (2017). Valorization of olive-oil industry solid waste: Statistical optimization of alkaline extraction conditions for light-coloured hemicelluloses. *GIDA* (2017) 42 (3): 329-338 doi: 10.15237/gida.GD16100

### **Abstract**

Olive solid waste (OSW), the by-product of olive oil production process, is a lignocellulosic material with very low economic value. The hemicellulose fraction of OSW has a potential to be used as a raw material for several industrial applications. The main objective of the present work was to statistically develop an alkaline hemicellulose extraction procedure to achieve the highest possible crude hemicellulose extraction yield from OSW with concurrent efforts to lighten the colour of black hemicelluloses. Box-Behnken Design based response surface methodology was employed for optimization. The optimum hemicellulose extraction conditions were found as 19.3% (w/v) alkaline (KOH) concentration, 1.3 mm particle size, 25.3 h extraction time, 1% (w/v) MgSO<sub>4</sub> concentration, 6.4% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and 60°C temperature. The maximum experimental hemicelluloses yield at this condition was 35.6±0.5% which is in agreement with the predicted yield value of 31.2%. As a result, the extraction yield has been increased from 21.7% to 35.6% (w/w). The colour values (L\*,a\*,b\*) of hemicelluloses extracted at optimum conditions were predicted as 31.69±0.28, -2.90±0.04 and 5.49±0.04, sequentially. The findings of this study demonstrated the route for isolation of light-coloured OSW hemicelluloses that have potential for conversion into industrially important value-added products such as biodegradable plastics for food packaging applications and xylooligosaccharides.

**Keywords:** Olive solid waste, pretreatment, hemicellulose, extraction, optimization, response surface methodology, waste valorization

## **ZEYTİNYAĞI ENDÜSTRİSİ KATI ATIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ: AÇIK RENKLİ HEMİSELÜLOZLAR İÇİN ALKALİ ÖZÜTLEME KOŞULLARININ İSTATİSTİKSEL OPTİMİZASYONU**

### **Öz**

Zeytinyağı üretim sürecinin yan-ürünü olan zeytin katı atığı (ZKA), çok düşük ekonomik değere sahip bir lignoselülozik materyaldir. ZKA'nın hemiselüloz fraksiyonu, birçok endüstriyel uygulama için hammadde olarak kullanım potansiyeline sahiptir. Bu çalışmanın temel amacı, ZKA'dan mümkün olan en yüksek ham hemiselüloz özütlemeye verimine ulaşmak için bir alkali özütleme tekniğinin istatistiksel olarak geliştirilmesi ve bunun yanında siyah hemiselülozların renginin açılmasıdır. Optimizasyon için Box-Behnken Tasarımı temelli tepki yüzey metodolojisi kullanılmıştır. Optimum hemiselüloz özütleme koşulları %19,3 (a/h) alkali (KOH) konsantrasyonu, 1,3 mm partikül büyüklüğü, 25,3 saat özütleme süresi, %1 (a/h) MgSO<sub>4</sub> konsantrasyonu, %6,4 (h/h) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu ve 60°C sıcaklık olarak tespit edilmiştir. Bu koşullardaki en yüksek deneysel hemiselüloz verimi %35,6±0,5 olup, teorik değer olan %31,2 ile uyumludur. Sonuç olarak, özütleme verimi %21,7'den %35,6'ya (a/a) çıkarılmıştır. Optimum koşullarda özütlenen hemiselülozların renk değerleri (L\*,a\*,b\*) sırasıyla 31,69±0,28, -2,90±0,04 ve 5,49±0,04 olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonuçları, gıda paketlenme uygulamaları için biyobozunur plastikler ve ksilooligosakkaritler gibi endüstriyel öneme sahip katma değerli ürünlere dönüştürülme potansiyeline sahip açık renkli ZKA hemiselülozlarının izole edilmesi için yol göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Zeytin katı atığı, ön işlem, hemiselüloz, özütleme, optimizasyon, tepki yüzey metodolojisi, atık değerlendirme

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ didemkocabas@kmu.edu.tr, © (+90) 338 226 2000/5008, ☎ (+90) 338 226 2214

## INTRODUCTION

Plant biomass components such as lignocellulosic residues have attracted more attention within the last two decades due to the rapid decrease in the amounts of fossil resources (1). Lately, many efforts have been employed for the conversion of biomass and other waste residues into new value-added products, within valorization approach (2). Biomass is a sustainable and renewable resource for the production of biofuels, materials and green chemicals and it is a putative source for carbon-based products with a remarkable reduction of CO<sub>2</sub> release into the atmosphere (3, 4). Lignocellulosic biomass is made up of three types of biopolymers: cellulose (45-55%), hemicellulose (25-35%), lignin (20-30%) and hemicelluloses are the most abundant biopolymers after cellulose. Despite of the huge production rate, hemicelluloses are still wasted during bio-based processes. On the contrary, hemicelluloses have many attractive properties including biodegradability, biocompatibility and bioactivity. Due to these excellent features, hemicelluloses are used in many industrial areas such as food, medicine, energy, chemicals and polymeric materials production, hence they are in the focus of growing scientific interest (5). In the last decade, hemicelluloses have received increasing attention for the production of biodegradable films and coatings because the bulk of engineered plastic materials used today are made from petroleum-based synthetic polymers which generate many problems due to their non-renewable nature and ultimate disposal (6, 7). A superior property of hemicellulose (xylan) based films is their low oxygen permeability, which makes them attractive in certain food packaging applications (7). Xylan based films also possess good intrinsic barrier properties against polar migrants such as aromas (8). In addition, hemicelluloses are raw materials for oligosaccharides which act as potential prebiotics (9). Encapsulation applications of hemicelluloses are reported for food and pharmaceutical use (10, 11). Therefore, extraction of hemicelluloses from different low-cost and non-food lignocellulosic feedstocks makes them attractive for further studies. The composition of hemicelluloses varies between type and source of feed stocks, their origin and growth stage. In lignocellulosic structure,

hemicellulose is bound to cellulose and lignin and detailed isolation procedures are necessary to separate these components (12). Different extraction techniques have been performed and generally heat treatment is combined with alkali, acid or hydrogen peroxide (13). Biomass pretreatment is the most expensive step in bioprocesses representing about 20% of the total cost which limits the conversion of biomass into products (14, 15). Therefore, optimization of pretreatment methods has a great economical importance in terms of industrial applications. Alkali extraction is a chemical pretreatment technique which can be performed at room temperature and times ranging from seconds to days. Alkali extraction causes less sugar degradation than acid pretreatment and it is more effective on agricultural residues than on wood materials (16). A mild alkaline peroxide process has shown to provide a successful delignification with minimal loss of lighter-in-colour hemicelluloses (17).

The olive (*Olea europaea*) is an evergreen tree cultivated for the production of table olives and oil. Globally, Mediterranean region is the dominating olive production area, where olive oil production has been started more than 7000 years ago. Olive cultivation has also spread globally during past two decades due to the health benefits assigned to olive oil. In year 2013, global olive production exceeded 20 million tonnes (1, 18, 19). The liquid and solid non-food residues of these milling processes have great negative environmental impact on microbial population of soil, aquatic ecosystems and air (20). Depending on the oil extraction technology used, every 100 kg of olives generates 35-45 kg of olive solid waste (OSW). To valorize this waste, there has been increasing attention on the re-use and recycling potential of OSW for the production of value-added products (21). Thus, the aim of the study was to maximize the amount of the extracted crude hemicellulose from OSW by a two-phase statistical optimization process, with concurrent efforts to lighten its colour. Overall, six extraction process parameters were studied. In the first phase; alkali (KOH) concentration, OSW particle size, extraction time, and in the second phase; MgSO<sub>4</sub> concentration, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and temperature were optimized. Specifically, the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the colour of

hemicelluloses was investigated. While several studies dealing with OSW are available, to the best of our knowledge, there is no study in literature which reports optimization of light-coloured hemicellulose extraction from OSW.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

OSW of olives grown in Aegean region of Turkey was obtained from Uşaklı Pirina (Aydın, Turkey). Without any treatment, OSW was ground to a particle size according to the experimental design and was further used in optimization studies.

### Experimental design

The conditions for hemicellulose extraction from OSW were optimized in two phases by using response surface methodology (RSM) based on Box-Behnken Design (BBD). In the first optimization phase, three independent variables were tested: alkali (KOH) concentration ( $X_1$ ), particle size ( $X_2$ ) and time ( $X_3$ ). In the second phase, the results of the first phase were used as the starting point and further optimization was performed by testing another three independent variables:  $MgSO_4$  concentration ( $X_4$ ),  $H_2O_2$  concentration ( $X_5$ ) and temperature ( $X_6$ ). The range and levels of the independent variables are given in Table 1. For each optimization phase, 15 experimental runs with different combinations of the three selected variables were performed in two replicates with three center points according to the BBD matrix. Minitab® Release 17 Statistical Software (USA) was used for the analysis of the data. A full quadratic model was adopted to predict

the optimum points according to Equation 1;

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j \quad \text{Equation 1}$$

where  $Y$  is the predicted response (hemicellulose extraction yield, %),  $b_0$  intercept (constant),  $b_i$  linear coefficients,  $b_{ii}$  squared coefficients,  $b_{ij}$  interaction coefficients and  $X$  is the coded level of the independent variable.

### Extraction of hemicellulose fraction

The hemicellulose extraction method was based on the alkaline extraction procedure described by Zilliox and Debeire (1998) and Bahcegul et al. (2014), with some modifications (22,7). OSW was ground to a particle size according to the experimental design and 10 g OSW was washed with 200 ml of distilled water. The suspension was filtered and OWP was transferred into 80 ml of alkaline (KOH) solution at given concentration and the extraction was set for proper hours at room temperature. At the end of pretreatment, the alkaline insoluble residue (cellulose fraction) was collected by centrifugation. Alkaline soluble hemicellulose was precipitated by the addition of 250 ml of acetic acid:ethanol (1:10, v/v) solution. The mixture was left to precipitate for 10 minutes and hemicellulose fraction was collected by centrifugation. Hemicellulose particles were dried at room temperature ( $45 \pm 5\%$  humidity) to constant weight.

The optimum conditions predicted in the first optimization phase were the starting points of the second optimization phase. The primary aim of this extraction phase was to maximize the hemicellulose yield and the secondary purpose was to obtain hemicelluloses which are lighter in colour. To obtain light-colored hemicelluloses

Table 1. The levels of independent variables of BBD

Optimization phase-1	Independent variable code	Independent variable name	Level		
			-1	0	+1
	$X_1$	Alkali (KOH) concentration (%)	10	20	30
	$X_2$	Particle size (mm)	1	2	3
	$X_3$	Time (h)	6	24	42
Optimization phase-2	Independent variable code	Independent variable name	Level		
			-1	0	+1
	$X_4$	$MgSO_4$ concentration (%)	0	0.5	1
	$X_5$	$H_2O_2$ concentration (%)	0	4	8
	$X_6$	Temperature (°C)	20	40	60



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used, which delignifies plant materials with subsequent colour change (17). Prior to alkaline peroxide extraction, 10 g of grounded and sieved OSW was weighted and washed with chelate agent, 200 ml ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) solution (1%, w/v), for 1 hour. The use of EDTA is necessary before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment because EDTA removes the metal ions from the solution. The metal ions were reported to decompose H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and reduce delignification process performance (13). After EDTA treatment, OSW was washed thoroughly with distilled water until the pH of filtrate became 7.0. OSW was filtered to remove the excess water and was transferred into alkaline solution which was an aqueous solution of KOH, MgSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It is known that chelation not only removes heavy metals, but also alkali earth metals which act as stabilizer of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during extraction. Therefore, MgSO<sub>4</sub> was added to increase the magnesium concentration, thus to stabilize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Proper volume of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added into the KOH solution (19.3%, w/v) and a calculated amount of MgSO<sub>4</sub> was mixed and volume of the solution was adjusted to 80 ml. Extraction process was carried out in a thermostat-controlled water bath at given temperature. Likewise the prior extractions, liquid part was removed by centrifugation, hemicellulose was precipitated by the addition of 250 ml of acetic acid:ethanol (1:10, v/v) solution. The obtained hemicellulose was dried at room temperature (45±5% humidity) and the yield was calculated after hemicellulose reached the constant weight.

In both of the optimizations phases, hemicelluloses yield values (% w/w) were calculated according to Equation 2. The statistical analysis was performed for independent variables and the optimum conditions for the maximum hemicellulose extraction yields were determined. The optimum conditions were verified experimentally with four replicates.

$$\text{Hemicelluloses yield (\%)} = \frac{\text{Dry weight of extracted hemicelluloses (g)}}{\text{Dry weight of olive solid waste (g)}} \times 100$$

Equation 2

### Colour Measurement

The colour of hemicelluloses was determined by using 30% (w/v) aqueous solutions of hemicellulosic fractions at room temperature.

The colour measurement was performed by using a colorimeter (Hunterlab ColorFlex CFLX-45, USA) which was calibrated with standard black and white calibration plates. The Hunterlab color scale (L\*,a\*,b\*) was used for analysis. The hemicellulose samples were analyzed in four replicates and the results were given as mean ± standard deviation.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Optimization of hemicellulose extraction conditions (Phase-1)

In the first optimization phase, a series of experiments were conducted in order to determine the influence of three extraction parameters (alkali concentration, particle size, time) on the yield of hemicellulose extraction. The experimental design and hemicellulose yield results are given in Table 2. The observed hemicellulose yields were in the range of 7.8 to 22.4%. The best fit was observed by using full quadratic model and the results of regression analysis are given in Table 3. Equation 3 was attained with a high coefficient of determination, *R*<sup>2</sup> value of 0.904, indicating that 90.4% of the variability in the response could be explained by the full quadratic model equation. *T* and *P* (probability) values are used to predict the significance of each coefficient and interactions between the variables. As an accepted rule, the smaller the *P*-value (generally less than 0.05) and larger the *T* value, the more significant the corresponding coefficient (23). Among the independent variables, OSW particle size (*X*<sub>2</sub>) showed a significant effect on hemicellulose extraction yield. The negative sign of particle size coefficient demonstrates an effect to decrease the extraction yield, whereas positive coefficient of time indicates an effect to increase the yield. The square term of time variable has a *P*-value below 0.05 and it showed a significant negative effect on the response. Analysis of variance (ANOVA) was performed to check the statistical significance of the full quadratic model. A low value of *P* (<0.05) and a high value of *F* (5.20) indicated that the model is statistically significant (data not shown).

$$\text{Hemicellulose yield (\%)} = 21.70 - 0.01 X_1 - 3.89 X_2 + 1.40 X_3 - 3.46 X_1 X_2 - 2.96 X_2 X_3 - 7.24 X_3 X_1 + 0.78 X_1 X_2 + 0.05 X_1 X_3 + 0.70 X_2 X_3 \quad \text{Equation 3}$$

Table 2. Experimental design of two-phase optimization strategy and hemicellulose extraction yields (% w/w) on dry weight basis

	Run	KOH concentration ( $X_1$ )	Particle size ( $X_2$ )	Time ( $X_3$ )	Experimental hemicellulose yield (%)	Predicted hemicellulose yield (%)	Residual
	Optimization phase-1	1	1	1	0	9.70	12.15
2		1	-1	0	20.40	18.37	2.03
3		-1	1	0	8.60	10.62	-2.02
4		-1	-1	0	22.40	19.95	2.45
5		1	0	1	12.70	12.44	0.26
6		-1	0	-1	9.40	9.66	-0.26
7		1	0	-1	9.70	9.54	0.16
8		-1	0	1	12.20	12.36	-0.16
9		0	1	1	11.90	9.71	2.19
10		0	-1	-1	12.50	14.69	-2.19
11		0	1	-1	7.80	5.51	2.29
12		0	-1	1	13.80	16.09	-2.29
13		0	0	0	21.50	21.70	-0.20
14		0	0	0	21.30	21.70	-0.40
15		0	0	0	22.30	21.70	0.60
	Run	MgSO <sub>4</sub> concentration ( $X_4$ )	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration ( $X_5$ )	Temperature ( $X_6$ )	Experimental hemicellulose yield (%)	Predicted hemicellulose yield (%)	Residual
Optimization phase-2	1	-1	0	-1	12.62	12.332	0.288
	2	0	0	0	21.94	20.420	1.520
	3	0	1	1	23.92	23.989	-0.069
	4	0	0	0	19.46	20.420	-0.960
	5	1	0	1	30.16	30.447	-0.287
	6	-1	1	0	15.60	16.416	-0.816
	7	-1	-1	0	12.67	13.026	-0.356
	8	1	1	0	23.06	22.704	0.356
	9	1	0	-1	11.18	12.065	-0.885
	10	-1	0	1	16.55	15.665	0.885
	11	0	-1	1	17.75	18.279	-0.529
	12	0	-1	-1	10.78	10.711	0.069
	13	0	0	0	19.86	20.420	-0.560
	14	0	1	-1	10.37	9.841	0.529
	15	1	-1	0	22.07	21.254	0.816

The contour plots of three independent variables studied in the first optimization phase against hemicellulose extraction yield (response) were used to further understand the results of the statistical analysis (Figure 1-a). The contour plots revealed that the response surface had a maximum point which is the optimum extraction condition for the first phase of optimization. The optimum point for maximum crude hemicellulose extraction yield was found as; -0.0707 for  $X_1$  (19.3% KOH concentration), -0.6566 for  $X_2$  (1.3 mm particle size) and 0.0707 for  $X_3$  (25.3 h time), which was verified experimentally with four replicates. The maximum hemicellulose yield obtained at optimized conditions was found as 25.0%. This result was in agreement with the yield of 23.0%, predicted by the model.

**Optimization of hemicellulose extraction conditions (Phase-2)**

The experimental design and hemicellulose yield results of second phase are given in Table 2. Levels of hemicellulose yield ranging from 10.37 to 30.16% were observed. The best fit was observed by using full quadratic model and the results of regression analysis are given in Table 3. The coefficient of determination ( $R^2$ ) was found as 0.984 which indicates a high correlation (98.4%) between the experimentally observed and predicted values, thus the significance of the model. Regardless of the significance of coefficients, a second order polynomial equation (Equation 4) was predicted. According to the low  $P$ -values (<0.05) and positive coefficients, all linear variables showed a significant positive impact on hemicelluloses extraction yield. The highest

Table 3. Estimated regression coefficients for hemicellulose extraction

	Term	Coefficient	T	p
Optimization phase-1	Constant	21.70	13.13	0.000
	KOH concentration	-0.01	-0.01	0.991
	Particle size	-3.89	-3.84	0.012
	Time	1.40	1.38	0.225
	KOH concentration * KOH concentration	-3.46	-2.32	0.068
	Particle size * Particle size	-2.96	-1.99	0.103
	Time * Time	-7.24	-4.86	0.005
	KOH concentration * Particle size	0.78	0.54	0.612
	KOH concentration * Time	0.05	0.03	0.973
	Particle size * Time	0.70	0.49	0.646
S = 2.318 R-Sq = 90.4% R-Sq(adj) = 73.0%				
	Term	Coefficient	T	p
Optimization phase-2	Constant	20.420	29.01	0.000
	MgSO <sub>4</sub> concentration	3.629	8.42	0.000
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration	1.210	2.81	0.038
	Temperature	5.429	12.59	0.000
	MgSO <sub>4</sub> concentration * MgSO <sub>4</sub> concentration	-0.074	-0.12	0.912
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration * H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration	-1.996	-3.15	0.025
	Temperature * Temperature	-2.719	-4.28	0.008
	MgSO <sub>4</sub> concentration * H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration	-0.485	-0.80	0.462
	MgSO <sub>4</sub> concentration * Temperature	3.763	6.17	0.002
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration * Temperature	1.645	2.70	0.043
S = 1.220 R-Sq = 98.4% R-Sq(adj) = 95.6%				

positive contribution to the response was made by temperature with the highest coefficient (5.43). The influence of square terms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and temperature were also significant. The highest positive contribution to the response was made by the interaction between MgSO<sub>4</sub> concentration and temperature. A very low *P*-value (0.001) and a very high *F* value (34.43) were obtained by ANOVA (data not shown). This result demonstrated that the full quadratic model was well adjusted to the experimental data and the model was highly significant.

$$\text{Hemicellulose yield (\%)} = 20.420 + 3.629 X_4 + 1.210 X_5 + 5.429 X_6 - 0.074 X_4^2 - 1.996 X_5^2 - 2.719 X_6^2 - 0.485 X_4 X_5 + 3.763 X_4 X_6 + 1.645 X_5 X_6 \quad \text{Equation 4}$$

The resulting contour plots are shown in Figure 1-b. The optimal treatment was found to be at 1.0 for *X*<sub>4</sub> (1% MgSO<sub>4</sub> concentration), 0.596 for *X*<sub>5</sub> (6.4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration) and 1.0 for *X*<sub>6</sub> (60°C temperature). Hemicellulose extraction yield tests were performed at the predicted optimum extraction conditions with four replicates and the maximum yield was observed as

35.6±0.5%. This result is in agreement with the predicted yield value of 31.2%. The lower and higher limits of the model in 95% prediction interval (PI) for hemicellulose yield are given by Minitab as 26.8% and 35.5%, respectively. It can be concluded that the experimental yield (35.6±0.5%) is at the higher limit in 95% PI, which shows the acceptability of the proposed model. As the result of two-phase optimization procedure, optimum crude hemicellulose extraction conditions were determined as 19.3% (w/v) alkaline (KOH) concentration, 1.3 mm particle size, 25.3 h extraction time, 1% (w/v) MgSO<sub>4</sub> concentration, 6.4% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and 60°C temperature. The hemicellulose extraction yield was increased from an average initial yield value of 21.7 to 35.6%, which corresponds to 64% increase compared to the initial conditions. There are a few studies in literature regarding the hemicellulose content of OSW. Heredia-Moreno et al. (1987) reported the hemicellulose composition of olive stones and their woody fractions as 30.5-27.4% and 27.0-35.1% for different varieties, respectively (24). Albuquerque et al. (2004) have determined an average hemicellulose composition of 350.8 g/kg on dry weight basis, which corresponds to 35.08% (w/w) (25). In another

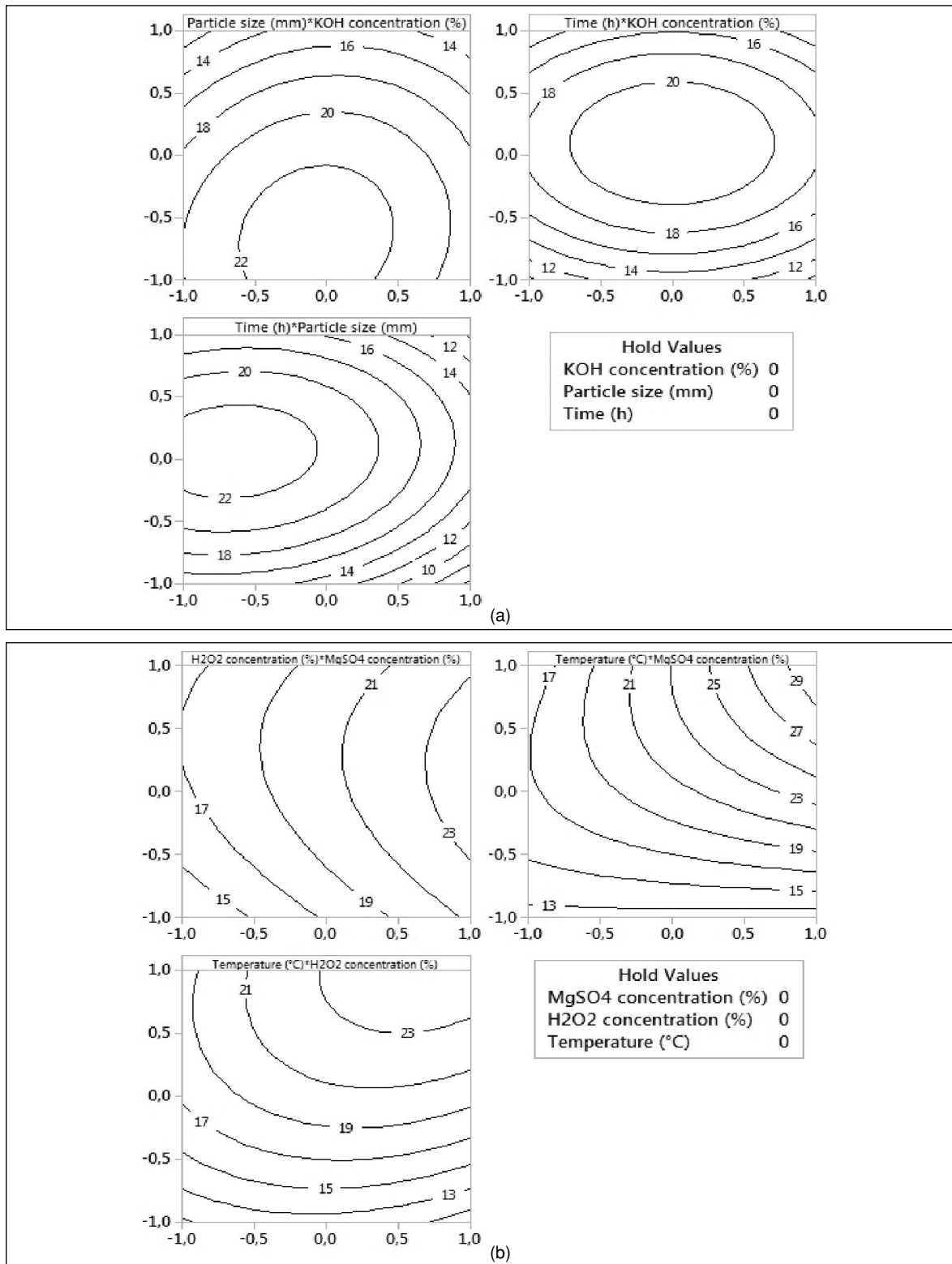


Figure 1. Contour plots (a) showing the effect of KOH concentration, particle size and extraction time on hemicellulose extraction yield of the first optimization phase, (b) showing the effect of MgSO<sub>4</sub> concentration, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and temperature on hemicellulose extraction yield of the second optimization phase

study, hemicellulose fraction of olive stones was reported as 26.95% (w/w) (26). The extraction yield achieved at optimum conditions was  $35.6\pm 0.5\%$  in the present study, indicating the benefits of process optimization which ensures the achievement of practical limit of extractable hemicellulose yield. Olive oil by-products have several accepted applications in agriculture and in the production of bioactive phenolic compounds, animal feed, food dietary fiber, edible fungi, bioenergy, biofuels, microbial exopolysaccharides, enzymes and biosorbents. The majority of these applications are only described in the scientific literature. The legislations and effective R&D programs will give rise to utilization of olive oil by-products under optimized processes to successfully create a global olive biorefinery (27). From this point of view, the present study fills a gap in the scientific literature and represents a basis for further industrial applications.

Various pretreatment practices have been employed for different lignocellulosic materials so far and chemical and thermochemical techniques are reported as the most promising methods for industrial applications (16). Alkaline pretreatment is one of the widely used chemical pretreatment methods in which the concentration of alkali is an important factor (28). The starting point of the first optimization was 20% (w/w) KOH in this study which provides an average yield of 21.7%. After optimization, KOH dosage was decreased to 19.3% with concurrent increase of the yield. This result demonstrated a possibility of saving in KOH usage with simultaneous increase in the extraction yield. Higher particle sizes led to a reduction in hemicelluloses extraction yield. As expected, decreasing the particle size, hence increasing surface area between solute and solvent caused increasing amount of product (29). Presumably, 1.3 mm OSW particle size already possesses enough large (an optimum) surface area for extraction, so that size reduction does not further increase the hemicellulose yield. Duration of the treatment had an effect with positive response. Increase in temperature showed also a positive effect on the hemicellulose yield and the maximum yield was observed at the highest level of studied temperature range; 60°C. The physical effect of temperature on the extraction was probably the increasing solubility of hemicelluloses with increasing temperature

up to a certain value. At very high temperatures, different sugar compositions are determined in the extraction liquor and the risk for furfural production increases (30). Hemicellulose extraction yield was also highly responsive to  $\text{MgSO}_4$  addition and the maximum yield was observed at 1% (w/w)  $\text{MgSO}_4$  concentration. A similar influence was predicted by Brienzo et al. (2009) during the search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction (13).  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration had also a significant effect ( $P<0.05$ ) with positive response in the current study which is in agreement with the study of Brienzo et al. (2009) (13).

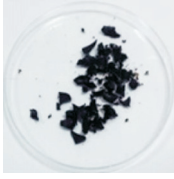
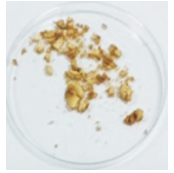
### Colour of hemicelluloses

The results of colour readings were summarized in Table 4. In Hunterlab colour scale,  $L^*$  value represents the darkness/lightness of the sample from 0 (black) to 100 (white). The aim of  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment in this study was to achieve light-in-colour hemicelluloses. Accordingly,  $L^*$  value of the OSW hemicellulose was increased from  $1.59\pm 0.24$  to  $31.69\pm 0.28$  after  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment which indicates the success of the delignification by  $\text{H}_2\text{O}_2$  and the lightness of the final product. Doner and Hicks (1997) demonstrated the positive effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on hemicellulose yield as well as the production of lighter-in-colour hemicelluloses during hemicellulose extraction of corn fiber (17). Fang et al. (1999) reported an optimum alkaline extraction solution which comprises 2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for wheat straw hemicelluloses (31). They aimed to lighten the color of hemicellulose solutions for a successful application in paint industry. Similar influence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the colour of hemicelluloses was observed in the present study. Hemicelluloses extracted with 8%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v) containing solutions were tannish, where hemicelluloses obtained at initial conditions were black in colour. The change in colour was also represented by the great increase in  $L^*$  value of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  treated hemicelluloses in compare to the untreated samples. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  treatment has provided light-coloured hemicelluloses, for potential utilization in certain food packaging applications and/or in paint industry.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Karamanoglu Mehmetbey University [BAP-02M14].

Table 4. The changes in colour of extracted hemicelluloses after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment

Hemicellulose	L*	a*	b*
A 	1.59±0.24	0.97±0.26	1.20±0.28
B 	31.69±0.28	-2.90±0.04	5.49±0.04

Data are presented as mean ± standard deviation for n=4

(A) Hemicellulose obtained at the optimum conditions of the first optimization phase (19.3% KOH concentration, 1.3 mm particle size and 25.3 h extraction time at room temperature).

(B) Hemicellulose obtained at the optimum conditions of the second optimization phase (19.3% KOH concentration, 1.3 mm particle size, 25.3 h extraction time, 1% MgSO<sub>4</sub> concentration, 6.4% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and 60°C temperature).

**KAYNAKLAR**

1. Romero-Garcia JM, Nino L, Martinez-Patino C, Alvarez C, Castro E, Negro MJ. 2014. Biorefinery based on olive biomass. State of the art and future trends. *Bioresour Technol* 159:421-432.

2. Nzihou A. 2010. Toward the valorization of waste and biomass. *Waste Biomass Valor* 1:3-7.

3. Fava F, Totaro G, Diels L, Reis M, Duarte J, Carioca OB, Poggi-Varaldo HM, Ferreira BS. 2015. Biowaste biorefinery in Europe: Opportunities and research & development needs. *New Biotechnol* 32:100-108.

4. Kalogiannis KG, Stefanidis S, Marianou A, Michailof C, Kalogianni A, Lappas A. 2015. Lignocellulosic biomass fractionation as a pretreatment step for production of fuels and green chemicals. *Waste Biomass Valor* 6:781-790.

5. Peng P, She D. 2014. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. *Carbohydr Polym* 112:701-720.

6. Saxena A, Ragauskas AJ. 2009. Water transmission barrier properties of biodegradable films based on cellulosic whiskers and xylan. *Carbohydr Polym* 78:357-360.

7. Bahcegul E, Toraman HE, Erdemir D, Akinalan B, Ozkan N, Bakir U. 2014. An unconventional approach for improving the integrity and mechanical properties of xylan type hemicellulose based films. *RSC Adv* 4:34117-34126.

8. Zhang Y, Pitkanen L, Douglade J, Tenkanen M, Remond C, Joly C. 2011. Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolated fractions. *Carbohydr Polym* 86:852-859.

9. Singh RD, Banerjee J, Arora A. 2015. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioact Carbohydr Diet Fibre* 5:19-30.

10. Tatar F, Tunç MT, Dervişoğlu M, Çekmecelioğlu D, Kahyaoglu T. 2014. Evaluation of hemicellulose as a coating material with gum arabic for food microencapsulation. *Food Res Int* 57:168-175.

11. da Silva AE, Marcelino HR, Gomes MCS, Oliveira EE, Nagashima Jr. T, Egito EST. 2012. *Xylan, a promising hemicellulose for pharmaceutical use, products and applications of biopolymers*. Ed: Dr. Johan Verbeek, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/products-and-applications-of-biopolymers/xylan-a-promising-hemicellulose-for-pharmaceutical-use>.

12. Hansen NML, Plackett D. 2008. Sustainable films and coatings from hemicelluloses: A review. *Biomacromolecules* 9:1493-1505.
13. Brienzo M, Siqueira AF, Milagres AMF. 2009. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. *Biochem Eng J* 46:199-204.
14. Yang B, Wyman CE. 2007. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioprod Bioref* 2:26-40.
15. Singhvi MS, Chaudhari S, Gokhale DV. 2014. Lignocellulose processing: a current challenge. *RSC Adv* 4:8271-8277.
16. Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, Negro MJ. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour Technol* 101:4851-4861.
17. Doner LW and Hicks KB. 1997. Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chem* 74:176-181.
18. Vera D, Jurado F, Margaritis NK, Grammelis P. 2014. Experimental and economic study of a gasification plant fuelled with olive industry wastes. *Energy Sustain Dev* 23:247-257.
19. Christoforou E, Fokaides PA. 2016. A review of olive mill solid wastes to energy utilization techniques. *Waste Manag* 49:346-363.
20. Ahmad-Qasem MH, Barrajon-Catalan E, Micol V, Mulet A, Garcia-Perez JV. 2013. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Res Int* 50:189-196.
21. Killi D, Anlauf R, Kavdir Y, Haworth M. 2014. Assessing the impact of agro-industrial olive wastes in soil water retention: Implications for remediation of degraded soils and water availability for plant growth. *Int Biodeterior Biodegrad* 94:48-56.
22. Zilliox C, Debeire P. 1998. Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: Adsorption and kinetic studies. *Enzym Microb Technol* 22:58-63.
23. Myers RH, Montgomery DC. 2002. *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*. John Wiley and Sons, New York.
24. Heredia-Moreno A, Guillen-Bejarano R, Fernandez-Bolanos J, Rivas-Moreno M. 1987. Olive stones as a source of fermentable sugars. *Biomass* 14:143-148.
25. Albuquerque JA, Gonzalez J, Garcia D, Cegarra J. 2004. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour Technol* 91:195-200.
26. Matos M, Barreiro MF, Gandini A. 2010. Olive stone as a renewable source of biopolyols. *Ind Crop Prod* 32:7-12.
27. Dermeche S, Nadour M, Larroche C, Mouliti-Mati F, Michaud P. 2013. Olive mill waste: Biochemical characterizations and valorization. *Process Biochem* 48:1532-1552.
28. Martinez PM, Bakker R, Harmsen P, Gruppen H, Kabel M. 2015. Importance of acid or alkali concentration on the removal of xylan and lignin for enzymatic cellulose hydrolysis. *Ind Crop Prod* 64:88-96.
29. Yılmaz Celebioglu H, Cekmecelioglu D, Dervisoglu M, Kahyaoglu T. 2012. Effect of extraction conditions on hemicellulose yields and optimisation for industrial processes. *Int J Food Sci Technol* 47:2597-2605.
30. Stuart PR, El-Halwagi MM. 2013. *Integrated Biorefineries: Design, Analysis, and Optimization*, CRC Press, Boca Raton, USA.
31. Fang JM, Sun RC, Salisbury D, Fowler P, Tomkinson J. 1999. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. *Polym Degrad Stab* 66:423-432.



# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Şahin-Nadeem, H., Topuz, A. Arslan Kulcan A., Torun, M., Özdemir, F.; *Colour change and weight loss during the roasting process for production of carob powder / Keçiboynuzu tozu üretiminde kavurma prosesi süresince renk değişimi ve ağırlık kaybı* .....252-260
- Yıldız, S., Yılmaz, A., Can, Z., Kılıç, C., Yıldız, Ü. C.; *Total phenolic, flavonoid, tannin contents and antioxidant properties of Pleurotus ostreatus and Pleurotus citrinopileatus cultivated on various sawdust / Çeşitli talaşlarda üretilen Pleurotus ostreatus ve Pleurotus citrinopileatus mantarlarının toplam fenolik, flavonoid ve tanen içerikleri ve antioksidan özellikleri* .....315-323
- Owaid, M. N., Muslat, M. M., Abed, I. A.; *Content of protein and ortho-dihydric phenol in Agaricus bisporus X25 cultivated on decomposed agrosubstrates / Farklı kompostlarda üretilen Agaricus bisporus X25 mantarlarının protein ve orto-dihidrik fenol içerikleri* .....324-328
- Sutay Kocabaş, D., Yurtdaş, E., Demir, A. N.; *Valorization of olive-oil industry solid waste: Statistical optimization of alkaline extraction conditions for light-coloured hemicelluloses / Zeytinyağı endüstrisi katı atığının değerlendirilmesi: Açık renkli hemiselülozlar için alkali özütleme koşullarının istatistiksel optimizasyonu* .....329-338

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Kormalı Ertürün, H. E.; Bazı içeceklerde titrasyon asitliğinin tayini için zofenopril kalsiyuma dayanan pH elektrot yapımı / *Construction of a pH electrode based on zofenopril calcium for the determination of titratable acidity in some beverages* .....211-218
- Kılınççeker, O.; Tara, tragakant ve agar agar gamlarının tavuk köftelerde kullanımı / *The use of tara, tragakant and agar agar gums in chicken meatballs* .....219-228
- İnci, A., Ünübol Aypak S., Güven, G.; Aydın ilinde üretilen inek sütlerinde bazı ağır metal düzeylerinin araştırılması / *Investigation of some heavy metal levels in cow milk collected from Aydın province* .....229-234
- Arpa, T. E., Cabaroğlu, T.; Elazığ yöresinde yetiştirilen Kösetevik üzüm çeşidinin kırmızı şarap üretimine uygunluk durumunun belirlenmesi / *Determination of suitability of Kösetevik grape variety cultivated in Elazığ province for the production of red wine* .....235-241
- Gül, Ü. D., Silah, H.; Tarımda kullanılan atrazinin gideriminde *Rhizopus arrhizus* kullanım potansiyelinin belirlenmesi / *Determination the potential usage of Rhizopus arrhizus for removal of atrazine used in agriculture* .....261-267
- Polat Yemiş, G., Karagöz Emiroğlu, Z., Candoğan, K.; Mercanköşk (*Oreganum heracleoticum* L.) ve bahçe kekiği (*Thymus vulgaris* L.) uçucu yağı içeren soya bazlı yenilebilir filmlerin patojen bakterilere karşı antimikrobiyel etkileri / *Antimicrobial effects of soy protein based edible film containing oregano (Oreganum heracleoticum L.) and thyme (Thymus vulgaris L.) essential oils against foodborne pathogens*.....268-276
- Sezer, E., Ayhan, Z., Çelikkol, T., Güner, F.; Zeolit katkılı aktif polietilen ambalaj malzemesinin kivi meyvesinin kalite özellikleri ve raf ömrüne etkisi / *Effect of zeolite added active packaging material on the quality and shelf life of kiwifruit* .....277-286
- Can, N., Duraklı Velioglu, S.; Tekirdağ'da satışa sunulan ıhlamur (*Tilia* spp.) ve kuşburnu (*Rosa canina*) örneklerinde aflatoksin varlığının araştırılması / *Determination of aflatoxins in linden (Tilia spp.) and rosehip (Rosa canina) samples sold in Tekirdağ province*..... 287-296
- Karaça, A. C., Başkaya, H., Güzel, Ö., Ak, M. M.; Püskürtmeli kurutma işleminin meyve suyu konsantrelerinin fenolik madde içeriğine ve antioksidan aktivitesine etkisi / *Effect of spray drying on phenolic content and antioxidant activity of fruit juice concentrates*..... 297-304
- Kesmen, Z., Büyükkiraz, M. E., Kahraman, N., Yetim, H.; Gıdalarda hile amacıyla kullanılan bazı bitki kaynaklı bileşenlerin gerçek zamanlı PZR ile tespiti / *Detection of fraudulent practices involving some plant derived compounds in foods using real-time PCR*..... 305-314

## Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Yüce, S., Tahtacı, S., Başyigit Kılıç, G.; Halofilik laktik asit bakterilerinin ürettiği hidrolitik enzimler / *The hydrolytic enzymes produced by halophilic lactic acid bacteria* .....242-251