

GIDA



THE JOURNAL OF FOOD

E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 44

SAYI / NUMBER : 2

YIL / YEAR : 2019

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: 44 • Sayı / Number: 2 • 2019
 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 Kurulu / Editorial Board	Danışma Kurulu / Advisory Board
<p>Baş Editör/ Editor-in Chief ERİNÇ, Hakan; Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey</p> <p>Editörler / Editors ÇAKIR, İbrahim; Abant İzzet Baysal University, Turkey HALKMAN, A. Kadir; Ankara University, Turkey ÖZDEN, Özkan; Istanbul University, Turkey TABAN, Birce; Ankara University, Turkey</p> <p>Yönetim Yeri Adres / Address Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey</p> <p>Tel: (+90) 0534 968 5994 • Faks: (+90) 312 317 8711 E-posta/E-mail: dergi@gidaderneği.org URL: http://www.gidaderneği.org</p> <p>Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli</p> <p>Hazırlayan/ Prepared Onay Ofset Matbaacılık G.M.K. Bulvarı No: 108/1 Maltepe / Ankara Turkey</p> <p>Tel: (+90) 312 230 22 09 e-mail: onayofset@gmail.com</p> <p>Yayın Tarihi/ Publication Date 15 04 2019</p>	<p>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, Mükerrrem 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 Frío, 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 fiahin, Serpil Middle East Technical University, Turkey fianlıbaba, Pınar Ankara University, Turkey Üstünoğlu, Zeynep Michigan State University, USA Yetişemiyen, Atila Ankara University, Turkey</p>

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 (Sciwindex), 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 (Sciwindex), 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)

- Haruna Tela, A, Karatas, F., Saydam, S. *Comparison of vitamin, peptide and malondialdehyde content of different eggs / Farklı yumurtaların vitamin, peptid ve malondialdehit içeriğinin karşılaştırılması* **216-225**
- Guven, B., Duraklı Velioglu, S., Boyacı, I. H. *Rapid identification of some sweeteners and sugars by attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR), near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy / Bazı tatlandırıcı ve şekerlerin zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR), yakın kızılötesi (NIR) ve Raman spektroskopisi ile hızlı tanımlanması* **274-290**
- Gülseren, İ., Çakır, B., Çağlar, A. F. *Preliminary investigations in vitro ace-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals / Soğuk pres fındık posalarından üretilmiş triptik peptitlerin in vitro ace inhibe edici aktiviteleri üzerine ön incelemeler* **309-317**
- Çalışkan Koç, G., Çabuk, B. *The effect of different microwave powers on the drying kinetics and powder properties of foam-mat dried egg white powder / Farklı mikrodalga güçlerinin köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı tozlarının kuruma kinetiği ve toz ürün özellikleri üzerine etkisi* **328-339**
- Uzunlu, S. *Assessment of some physicochemical and microbiological quality parameters of raw meatballs prepared with high pressurized meat / Yüksek basınç uygulanmış etle hazırlanan çiğ köftelerin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalite parametrelerinin değerlendirilmesi* **340-347**
- Atmaca, E. *Biomonitoring of some persistent organochlorine contaminants in the milk of Anatolian water buffaloes / Anadolu mandası sütlerinde bazı kalıcı organik klorlu kirleticilerin biyoizlenmesi* **348-356**

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Özpolat, E. Limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) uçucu yağlarının $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen Gökkuşluğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkileri / *Effects of lemon (Citrus limon) and bitter orange (Citrus aurantium) essential oils on microbiological quality of stored at $4\pm 1^\circ\text{C}$ rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)* **185-190**
- Alp, D., Kuleşan, H. Farklı kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi / *Determination of exopolysaccharide production and cholesterol assimilation abilities of lactic acid bacteria isolated from different sources* **191-201**
- Uçak, İ. Taze karideslerin raf ömrünün uzatılmasında soğan kabuğu ekstraktının etkisi / *The effects of onion peel extract in preventing shelf life of fresh shrimp* **226-237**
- Erginkaya, Z., Sankodal, E., Özkütük, S. T., Konuray, G., Ünal Turhan, E. Probiyotik bitter çikolata üretiminde mikroenkapsüle *Lactobacillus rhamnosus* kullanımı / *The use of microencapsulated Lactobacillus rhamnosus in probiotic bitter chocolate production* **238-247**
- Bulut Ergin, D., Koca, N. Toprağa gömerek veya buzdolabı koşullarında olgunlaştırmanın Sivas küp peynirinin özellikleri üzerine etkisi / *The effects of ripening of Sivas küp (jar) cheese storing under refrigerated conditions or being buried in the soil* **248-259**
- Atıl, Ö., Gülsünoğlu, Z. Kılıç Akyılmaz, M. Depo bağıl nemi ve sıcaklığının saray helvasının kalitesine etkileri / *Effects of storage relative humidity and temperature on quality of palace halva* **260-273**
- Bostancı, C., Ertuğrul Karatay, S., Dönmez, G. Yer fıstığı kabuğundan biyoetanol üretimi / *Bioethanol production from peanut shell* **291-300**
- Güven, G. Aydın ilinde tüketilen sebze ve meyvelerin eser element derişimlerinin tayini / *Determination of trace element concentrations of vegetables and fruits consumed in Aydın province* **301-308**
- Şimşek, A. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris L.*) betalainleri üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun etkisi / *The effect of thermal assisted ultrasonic extraction on the red beetroot (Beta vulgaris L.) betalains* **318-327**
- Yılmaz, F. M., Yıldırım, E., Karakuş, M. Doğal renk maddesi katkılı sert şekerleme üretimi: farklı karbonhidrat formülasyonlarının renk, camı geçiş, higroskopite, karbonhidrat kompozisyonu ve duyu özellikleri üzerine etkileri / *Production of natural colorant fortified hard candy: Effects of different carbohydrate formulations on colour, glass transition, hygroscopicity, carbohydrate composition and sensory properties* **357-368**
- Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. Nar kabuğundan antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu / *Optimization of the extraction conditions of phenolic compounds with antimicrobial and antioxidant activity from pomegranate peel* **369-382**

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)
- Bilecen Şen, D., Kılıç, B., Demir, E., Başyigit Kılıç, G. Et ve et ürünlerinde mikrobiyal dekontaminasyon için bazı ısı olmayan teknolojilerin kullanımı / *Applications of some non-thermal technologies for microbial decontamination in meat and meat products* **202-215**

LİMON (*Citrus limon*) VE ACI PORTAKAL (*Citrus aurantium*) UÇUCU YAĞLARININ 4±1°C'DE MUHAFAZA EDİLEN GÖKKUŞAĞI ALBALIKLARININ (*Oncorhynchus mykiss*) MİKROBİYOLOJİK KALİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Emine Özpolat*

*Fırat Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi, Elazığ, Türkiye

Geliş / *Received*: 26.12.2018; Kabul / *Accepted*: 06.02.2019; Online baskı / *Published online*: 26.02.2019

Özpolat, E. (2018). Limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) uçucu yağlarının 4±1°C'de muhafaza edilen gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkileri. *GIDA* (2019) 44 (2): 185-190 doi: 10.15237/gida.GD18128

Özpolat, E. (2018). *Effects of lemon (Citrus limon) and bitter orange (Citrus aurantium) essential oils on microbiological quality of stored at 4±1°C rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. *GIDA* (2019) 44 (2): 185-190 doi: 10.15237/gida.GD18128

ÖZ

Bu çalışmada farklı oranlardaki (kontrol, %3 ve %6) limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) kabuklarından elde edilen uçucu yağların, 4±1°C'de muhafaza edilen gökkuşığı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) mikrobiyolojik kalite özellikleri (mezofil aerob, psikrofil aerob, maya-küf, *Enterobacteriaceae* ve *Escherichia coli*) üzerine olan etkileri incelenmiştir. Yapılan analizler neticesinde; kullanılan uçucu yağ oranındaki artış ile birlikte mikrobiyolojik kalitenin olumlu yönde etkilendiği belirlenmiştir. Özellikle %6 oranında kullanılan limon ve acı portakal uçucu yağlarının, gökkuşığı alabalıklarının mikrobiyolojik kalitesini etkileyerek, toplam mezofil aerob bakteri sayılarına göre, raf ömrünü ortalama olarak 6 gün uzattığı görülmüştür. Limon ve acı portakal uçucu yağlarının etkilerinin benzer olduğu görülmüştür. Sonuç olarak basit, ucuz ve güvenli bir yöntem olarak limon ve acı portakal uçucu yağlarının, gökkuşığı alabalıklarının mikrobiyal kalitesini korumaya yardımcı olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Alabalık, limon yağı, portakal yağı, mikrobiyolojik kalite

EFFECTS OF LEMON (*Citrus limon*) AND BITTER ORANGE (*Citrus aurantium*) ESSENTIAL OILS ON MICROBIOLOGICAL QUALITY OF STORED AT 4±1°C RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

ABSTRACT

In the study, lemon (*Citrus limon*) and bitter orange (*Citrus aurantium*) peel essential oil at different rates (control, 3% and 6%) on microbiological quality properties (mesophilic aerob bacteria, psychrophilic aerob bacteria, yeasts and molds, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*) of stored at 4±1°C rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*) were examined. The analysis results in, it was found that the microbiological quality of the used essential oil ratio was affected positively. Especially; it has been determined that the lemon and bitter orange essential oils used at 6%, according to total mesophilic aerob bacteria, prolong the shelf life of rainbow trout by an average of 6 days. It has been observed that the effects of lemon and bitter orange essential oils are similar. As a result, it has been determined that lemon and bitter orange essential oils that simple, cheap and safe method, can be used to extend the rainbow trout of maintain microbiological quality.

Keywords: Rainbow trout, lemon oil, orange oil, microbiological quality

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ emineozpolat@firat.edu.tr,

☎ (+90) 424 237 0000/4539,

☎ (+90) 424 238 6287

GİRİŞ

Su ürünleri insanlar için ideal bir besin kaynağı olmalarının yanı sıra yapısı itibari ile kolay bozulabilen gıdalardır. Bu sebepten avlandıktan itibaren hızlı bir şekilde tüketilmeli veya uygun olan bir işleme tekniği ile muhafazaya alınmalıdır. Gıdaların muhafaza süresini uzatmak amacı ile birçok yöntem ve katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bu katkı maddeleri içinde güvenli, ekonomik ve kullanışlı olmaları münasebetiyle bitkisel içerikli katkı maddelerinin kullanımı giderek artmaktadır (Varlık vd., 2004; Çaklı, 2007; Çoban 2010).

Turunçgiller sınıfına giren limon ve portakal, ülkemizde Ege, Akdeniz ve kısmen de Doğu Karadeniz bölgelerindeki iklim şartlarının uygun olduğu yörelerde yetiştirilir. İyi bir C vitamini kaynağıdır. Genellikle turunçgil meyve suyu üretiminin bir yan ürünü olarak elde edilen limon ve portakal gibi yağların özellikle kimya endüstrisinde (şampuan, sabun, diş macunu) ve aromaterapi amaçlı kullanımı söz konusudur (Cemeroğlu, 2004; Verzera vd., 2004; Turhan vd., 2006). Narenciye meyvelerinin kabukları zengin flavon ve birçok polimetoksilenmiş flavonun zengin kaynaklarıdır ve antioksidant ve antimutajenik etkileri bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda küflerin gelişimi üzerine oldukça etkili oldukları ve gıdalarda antimikrobiyal amaçlı kullanılabilirliği vurgulanmıştır. (Dabbah vd., 1970; Tassou vd., 1995; Cemeroğlu, 2004; Verzera vd., 2004; Fisher ve Phillips, 2006; Turhan vd., 2006; Aibinu vd., 2007; Teixeira, 2013).

Bu çalışmada, farklı oranlardaki limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) kabuklarından elde edilen uçucu yağların, 4 ± 1 °C'de muhafaza edilen gökkuşağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) bazı mikrobiyolojik kalite özellikleri üzerine olan etkileri incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada kullanılan alabalıklar (*Oncorhynchus mykiss*) ortalama 200 ± 20 gr ağırlığında olup, Elazığ ilinde bulunan yöresel balıkçılardan taze olarak temin edilmiş ve Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi laboratuvarına soğuk muhafaza koşulları içerisinde getirilerek hemen işleme alınmıştır. Kullanılan limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) (%100) uçucu yağları

ise ticari olarak faaliyet gösteren Doğan Baharatçılık ve Kimyevi Maddeler Tic. ve San. A.Ş. (İstanbul, Türkiye)'den temin edilmiştir.

Balıklar temizlenip yıkandıktan sonra fileto haline getirilerek 5 gruba bölünmüş (kontrol, %3 ve %6 limon yağı, %3 ve %6 acı portakal yağı) ve ağırlıkları tartılarak ağırlık /hacim oranına göre hesaplanan uçucu yağlar filetolar üzerine uygulanmıştır. Uygulama işleminde; belirlenen miktarda ki uçucu yağlar balık filetoları üzerine el ile masaj yapılarak dağıtılmıştır. Bu işlem esnasında herhangi bir kontaminasyona yol açmaması için (eldiven kullanımı gibi) hijyen koşullarına oldukça dikkat edilmiştir. Daha sonra balıklar polietilen plastik tabaklara yerleştirilerek üzerleri streç film ile kaplanıp paketlenmiştir. Paketlenen örnekler 4 ± 1 °C'de muhafazaya alınmıştır. Araştırma üç tekerrürlü olarak yürütülmüş ve hazırlanan deneysel örnekler muhafazanın 0, 3., 6., 9., 12. ve 15. günlerinde analize alınmıştır.

Örnekler mikrobiyolojik analizler için bir parçalayıcının (Stomacher 400) özel torbasında 25 g tartılıp, üzerine steril %0,1'lik peptonlu sudan 225 ml ilave edilerek homojen hale getirilmiştir. Böylece örneğin 10^{-1} (1/10)'lik dilüsyonu hazırlanmıştır. Bu dilüsyondan aynı seyrelticiyi kullanmak suretiyle örneğin 10^{-6} 'ya kadar diğer seyreltileri hazırlanmıştır. Her seyreltisinden 0,1'er ml kullanılarak çift seri halinde plak dökme metoduyla ekimleri yapıldıktan sonra inkübasyon süresi sonunda 30-300 koloni içeren plaklar değerlendirilmiştir. Toplam mezofil aerob bakteri sayımları için Plate Count Agar (PCA) besi yeri kullanılarak ekimi yapılan plaklar 30°C'de 72 saat inkübe edildikten sonra oluşan koloniler değerlendirildi. Psikrofil aerob bakteri sayımları için gene aynı besi yeri kullanılarak, 7°C'de 10 gün inkübe edildi. *Enterobacteriaceae* sayımlarında Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) besi yeri kullanılıp hazırlanan plaklar 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Maya-küf sayımı için % 10'luk tartarik asit ilave edilerek pH'sı 3,5'e düşürülmüş Potato Dextrose Agar (PDA), 21 ± 1 °C'de 5 gün, *Escherichia coli* için ise Chromocult TBX Agar kullanılarak 30°C'de 4 saat canlandırma işlemi yapıp, daha sonra 44 ± 1 °C'de

24 saat inkübe edilmiştir (Oxoid, 1982; Halkman, 2005).

Yapılan bütün analizler neticesinde elde edilen sonuçlar; SPSS® 12.00 paket programı kullanılarak, muhafaza süresince gruplar içi ve gruplar arası farklılıkları tespit etmek amacıyla tek yönlü varyans analizine tabii tutulmuş ve Duncan karşılaştırma testi uygulanmıştır (Özdamar, 2001).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada farklı oranlardaki limon ve acı portakal uçucu yağlarının (%3 ve %6) gökkuşağı alabalıklarında $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'deki muhafazasında mikrobiyolojik kaliteleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada elde edilen toplam mezofilik aerob bakteri sayıları incelendiğinde (Şekil 1a) muhafaza başlangıcında tüm gruplarda $2,8-3,2 \log_{10}$ kob/g ($P > 0,05$) olan değerler muhafaza süresince tüm gruplarda istatistiki açıdan önem arz edecek seviyede ($P < 0,05$) yükselme gösterdiği ve balıklar için, tavsiye edilen maksimum limit değerinin ($6 \log_{10}$ kob/g) (ICMFS, 1992) kontrol grubunda 9. günde aşıldığı, diğer deneysel gruplarda ise 15. günde bu değere ulaşıldığı tespit edilmiştir. Gruplar arasında; limon ve acı portakal uçucu yağlarının muhafaza süresince genellikle benzer etkiler ($P > 0,05$) gösterdiği tespit edilirken, %6 oranında uçucu yağ ile hazırlanan deneysel gruplarda, toplam mezofilik aerob bakteri yükünün %3 lük gruplardan hep daha az yükselme gösterdiği ve bu farkın zaman zaman (9. ve 12. gün) istatistiki açıdan önemli olurken ($P < 0,05$), muhafazanın bazı günlerinde (0., 3., 6. ve 15. günler) ise önem arz etmeyecek kadar yakın olduğu görülmüştür ($P > 0,05$). İlgili literatürler incelendiğinde birçok bitki ve baharattan elde edilen uçucu yağların toplam mezofilik aerob bakteriler üzerine olumlu etkilerinin olduğu vurgulanmıştır (Çoban, 2010; Can vd., 2016; Özpolat vd., 2017). Türkiye'de bulunan *Citrus* türlerinin antimikrobiyal ve antifungal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada (Kırbaşlar vd., 2009) güçlü antimikrobiyal etkilerinin olduğunu ve özellikle limonun (*Citrus limon*) bu etkisinin daha güçlü olduğu vurgulanmıştır.

Psikrofil mikroorganizmalar soğuk ortamlarda üreyebilme özelliğine sahip olduklarından soğukta

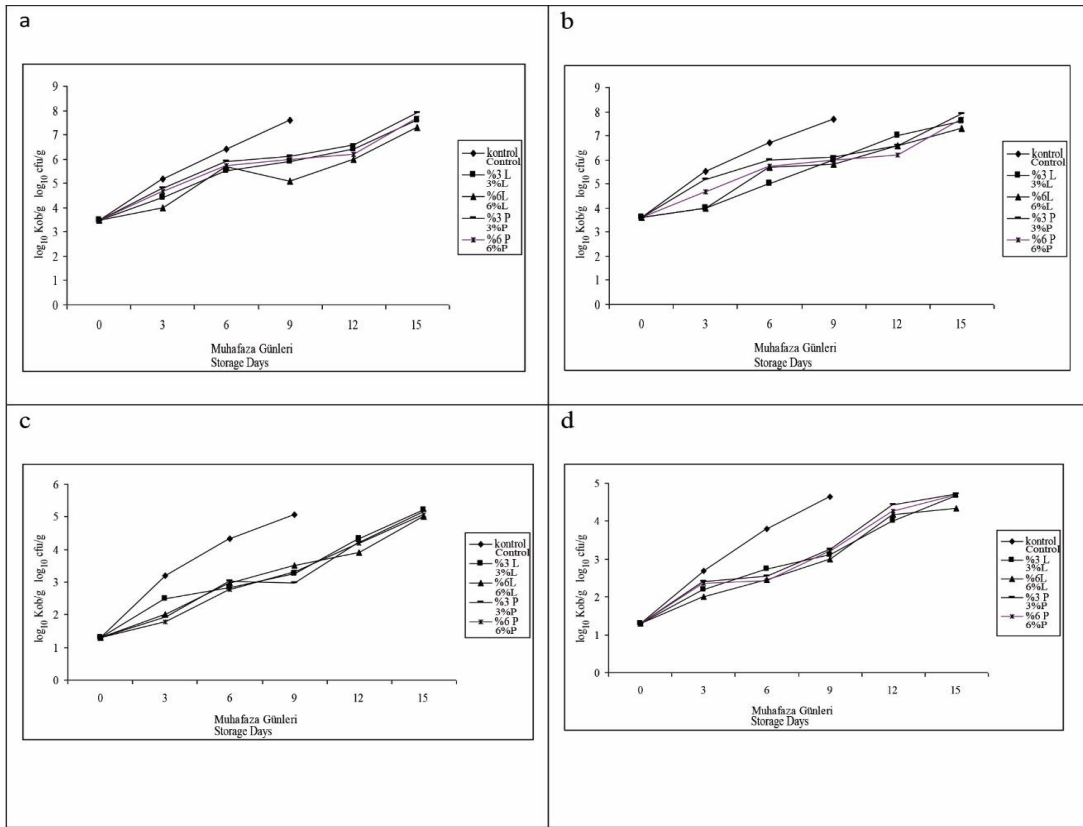
muhafaza edilen gıdalar için oldukça önemlidirler (Halkman, 2005). Çalışmada kullanılan alabalıklarda, çalışmanın ilk gününden itibaren tüm gruplarda muhafaza süresi ile birlikte istatistiki açıdan önemli farklılıkların olduğu görülmüştür ($P < 0,05$). Şekil 1b incelendiğinde, muhafaza süresine bağlı olarak psikrofil bakteri sayısındaki artışın, kullanılan uçucu yağ konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak daha az olduğu görülmektedir. Buda; uçucu yağ konsantrasyonundaki artışın psikrofil bakteri sayısının azalmasında etkili olduğu anlamına gelmektedir. Nitekim bitki ve baharatlardan elde edilen yağların bakteriler üzerine olan etkilerinin, kullanılan konsantrasyona bağlı olarak değiştiği birçok çalışmada da belirtilmiştir (Çoban, 2010; Can vd., 2016; Özpolat vd., 2017). Limon ve acı portakal uçucu yağlarının antimikrobiyal etkisinin olduğu (Kırbaşlar vd., 2009; Espina vd., 2011) ve gıdalarda potansiyel antimikrobiyal olarak kullanılabilceği (Aibinu vd., 2007; Fisher ve Phillips, 2008) çeşitli çalışmalarda da vurgulanmıştır.

Enterobakteriler gıdalarda genel hijyen indikatörü olarak bilinmektedirler (Halkman, 2005) ve temiz suların avlanan balıkların kaslarında bulunmamaktadırlar. Balık etleri ilk avlandıklarında işlem görmemiş halde iken steril olarak kabul edilirler ve bu grup bakterilerin varlığı bir fekal kontaminasyonun olabileceğini işaret etmektedir (Shewan, 1971). Limon ve acı portakal uçucu yağlarının Enterobakteriler üzerine olan etkileri incelendiğinde; tüm deneysel gruplarda muhafaza süresi ile birlikte artış gösterdiği ($P < 0,05$), fakat uçucu yağ uygulanan gruplarda bu artışın daha az olduğu görülmüştür (Şekil 1c). Uçucu yağ uygulanan gruplar arasında ise özellikle %6 oranında limon yağı uygulanan deneysel gruptaki artışın daha az olduğu ve bu farkın muhafaza süresi boyunca bazı günlerde (12. gün) istatistiki açıdan önemli olduğu ($P < 0,05$) görülmüştür. Nitekim; narenciyelerden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal özelliklerinin incelendiği bir çalışmada (Kırbaşlar, 2009) limondan elde edilen uçucu yağların, diğer narenciye meyvelerinden elde edilenlerden daha fazla antimikrobiyal etkisinin olduğu belirtilmiştir.

Araştırmada tüm deneysel gruplarda muhafaza süresince *E. coli* tespit edilmemiştir.

Maya ve küfler, balıklarda normal flora içerisinde bulunmazlar. Bunlar genellikle toprak orijinli olup, balıklar avlandıkları anda, sudan veya avlanma sonrası kullanılan alet ve malzemelerden bulaşmaktadırlar (Shewan, 1971; Gökten, 1990). Hazırlanan deneysel örneklerin maya-küf sayıları dikkate alındığında (Şekil 1d); muhafaza başlangıcında 1,28-1,75 log₁₀ kob/g iken, muhafaza süresi boyunca artış gösterdiği ($P < 0,05$) ve kontrol grubunda muhafaza sonunda (9. gün) 4,72 log₁₀ kob/g değerine ulaştığı tespit

edilmiştir. Uçucu yağ uygulanan gruplarda bu artış daha az olurken; %6 oranında limon yağı uygulanan deneysel grubun muhafazanın son gününde (15. gün) diğer uçucu yağ uygulanan gruplardan istatistiksel açıdan önemli ($P < 0,05$) derecede daha az olduğu belirlenmiştir. Bu verilere dayanarak limon ve acı portakalın maya-küf üzerine antifungal etkisinin olduğunu ve limon uçucu yağının acı portakaldan daha etkili olduğunu söylemek mümkündür. Kırbaşlar vd., (2009), yaptıkları çalışmalarında *Citrus* kabuklarından elde edilen yağların güçlü bir antifungal etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 1. Limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) uçucu yağlarının +4±1°C'de muhafaza edilen gökkuşuğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkileri.

Figure 1. Effects of lemon (*Citrus limon*) and bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils on microbiological quality of stored at +4±1°C rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

a: Toplam aerobik mezofil bakteri; b: toplam psikrofil bakteri; c: toplam *Enterobacteriaceae*; d: toplam maya-küf. Kontrol: herhangi bir uçucu yağ ilavesi olmadan; %3L: %3 limon uçucu yağı ilaveli; %6 L: %6 limon uçucu yağı ilaveli; %3 P: %3 acı portakal yağı ilaveli; %6 P: %6 acı portakal yağı ilaveli.

a: Total anaerobe bacteria; b: total psychrophile bacteria; c: total *Enterobacteriaceae*; d: total mold-yeast. Control: without essential oil; %3 L: 3% lemon essential oil supplement; %6 L: 6% lemon essential oil supplement; %3 P: 3% bitter orange essential oil supplement; %6 P: 6% bitter orange essential oil supplement.

Sonuç olarak; limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) kabuğundan elde edilmiş olan uçucu yağların; alabalıkların muhafaza süresince mikrobiyolojik kaliteyi korumak amacı ile kullanılabilir alternatif bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu uçucu yağ uygulamalarının tuzlama, paketlenme gibi yöntemler ile kombine edilerek kullanılması hem muhafaza süresini daha da arttırabilecek, hem de alternatif muhafaza yöntemleri olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, T., Odungbemi, T. (2007). Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of *Citrus Aurantifolia* (Lime fruit) as used locally. *Afr J Tradit Complem*, 4(2): 185-190.
- Baygar, T., Özden, Ö., Üçok, D. (2004). Dondurma ve çözündürme işleminin balık kalitesi üzerine etkisi. *Türk J Vet Anim Sci*, 28: 173-178.
- Can, Ö.P., Ağaoğlu, S., Alemdar, S. (2016). Biberiye ekstraktı ilavesinin tavuk köftesinin kalite özellikleri üzerine etkisi. *C.Ü. Sağ. Bil. Enst Derg*, 1: 01-06.
- Cemeroğlu, B. (2004). *Meyve ve sebze isleme teknolojisi*. Kùltür ve Turizm Bakanlığı, Ankara, Türkiye, ISBN: 975-98578-1-2.
- Çaklı, Ş. (2007). *Su ürünleri isleme teknolojisi*. 1., Ege Üniversitesi, Bornova-İzmir, Türkiye, 696 s. ISBN: 978-975-483-761-2.
- Çoban, Ö. (2010). Bazı esansiyel yağların tütsülenmiş ve vakum paketlenmiş gökkuşuğı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) filetolarının raf ömrüne etkisi. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Elazığ, Türkiye, 135 s.
- Dabbah R, Edwards V. M., Moats W.A. (1970). Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl Microbiol*, 19(1): 27-31.
- Eke, E. (2007). Farklı balık türlerinden marinat yapımı ve kalitesinin belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Samsun, Türkiye, 64s.
- Espina, L., Somolinos, M., Loran, S., Conchello, P., Garcia, D., Pagan, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22: 896-902. Doi:10.1016/j.foodcont.2010.11.021
- Fisher, K., Phillips, C.A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J Appl Microbiol*, 101: 1232-1240. Doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x
- Fisher, K., Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci Tech*. 19(3): 156-164. Doi:10.1016/j.tifs.2007.11.006
- Göktan, D. (1990). *Gıdaların mikrobiyal ekolojisi*. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakùltesi Yayın No: 21, Ege Üniversitesi Basım Evi, İzmir, Türkiye, 292s. ISBN: 975-483-055-X.
- Gürel İnanlı, A., Özpolat, E., Emir Çoban, Ö., Karaton, N. (2011). Alabalık keki yapımı ve ürünün duysal, kimyasal kalitesi. *BIBAD*, 4(1):149-153.
- Halkman, A. K. (2005). *Gıda mikrobiyolojisi uygulamaları*. Başak Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 358 s. ISBN: 975-00373-0-8.
- ICMSF (1992). International commission on microbiological specifications for foods. Sampling plans for fish and shellfish, In ICMSF (Ed.), *Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: Principles and scientific applications*, 2nd ed., Toronto, Canada: University of Toronto Press.
- Kırbaşlar, G.F., Tavman, A., Dülger, B., Türker, G. (2009). Antimicrobial activity of Turkish *Citrus* peel oils. *Pak J Bot*, 41(6):3207-3212.
- Olgunoğlu, A. İ. (2007). Marine edilmiş hamside (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) duysal, kimyasal ve mikrobiyolojik değişimler, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri

Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana, Türkiye, 111 s.

Oxoid (1982). The Oxoid Manual. 50 th Ed., Published by Oxoid Limited, Hampshire.

Özdamar, K. (2001). *SPSS ile biyoistatistik*. Kaan Kitabevi, Eskisehir, Türkiye, 452 s. ISBN: 978-6787-03-1.

Özpolat, E., Dikici, A., Koluman, A., Patır, B., Çalıcıoğlu, M. (2017). Biberiye esansiyel yağı ile dekontaminasyonun gökkuşuğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*, W. 1972) kalite özellikleri üzerine etkisi. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.* 31 (2): 131 – 136.

Shewan, J. M. (1971). The microbiology of fish and fishery products. A progress report. *J Appl Bacteriol*, 34: 299-315.

Tassou C.C., Drosinos E.H., Nychas, J. E. (1995). Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified

atmosphere or air. *J Food Protect*, 59(1):31-34. Doi.org/10.4315/0362-028X-59.1.31

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Saraiva, J.A., Nunes, M. N. (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Ind Crop Prod*, 43:587– 595.

Turhan, İ., Tetik, N., Karhan, M. (2006). Turunçgil kabuk yağlarının elde edilmesi ve gıda endüstrisinde kullanımı. *Gıda Derg.* 3: 71-77.

Varlık, C., Erkan, N., Özden, Ö., Mol, S., Baygar, T. (2004). *Su ürünleri işleme teknolojisi*. İstanbul Üniversitesi, Su ürünleri Fak., İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, 490 s. ISBN: 975-404-715-4.

Verzera, A., Trozzi, A., Dugo, G., Di Bella, G., Cotroneo, A. (2004). Biological lemon and sweet orange essential oil composition. *Flavour Frag J*, 19: 544-548. Doi: 10.1002/ffj.1348



FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLMİŞ LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN EKZOPOLİSAKKARİT ÜRETİMİ VE KOLESTEROL ASİMİLASYON YETENEKLERİNİN BELİRLENMESİ

Duygu Alp,* Hakan Kuleaşan

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

Geliş / *Received*: 04.06.2018; Kabul / *Accepted*: 09.02.2019; Online baskı / *Published online*: 26.02.2019

Alp, D., Kuleaşan, H. (2019). Farklı kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (2): 191-201 doi: 10.15237/gida.GD18059

Alp, D., Kuleaşan, H. (2019). Determination of exopolysaccharide production and cholesterol assimilation abilities of lactic acid bacteria isolated from different sources. GIDA (2019) 44 (2): 191-201 doi: 10.15237/gida.GD18059

ÖZ

Bağırsak sistemimizde yer alan yararlı mikroorganizmaların önemli özelliklerinden birisi gastrointestinal sistemdeki farklı koşullara karşı direnç gösterebilmeleridir. Bu koşullar arasında safra tuzlarına karşı direnç ve düşük pH'da gelişim yer almaktadır. Gastrointestinal sistemde canlılıklarını sürdürebilmek için yararlı bakteriler spesifik enzim sentezi veya ekzopolisakkarit üretimi gibi çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu çalışmada çeşitli fermente gıdalardan ve bitkilerden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin safra tuzu dirençleri, düşük pH'da gelişim özelliklerinin yanı sıra, ekzopolisakkarit üretimleri ve kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiştir. Ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerinin 11.9 ile 1.1 mg/L arasında değiştiği belirlenirken toplam kolesterol asimilasyon yüzdeleri % 60.71 ile % 16.71 arasında değişim göstermiştir. Kolesterol asimilasyon yetenekleri ile EPS üretimleri arasında bir bağlantı bulunamamıştır.

Anahtar kelimeler: Kolesterol asimilasyonu, ekzopolisakkarit, düşük pH, safra tuzu direnci

DETERMINATION OF EXCOPOLISACCHARIDE PRODUCTION AND CHOLESTEROL ASSIMILATION ABILITIES OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES

ABSTRACT

One of the most important features of the intestinal flora is resistance to many conditions in the gastrointestinal tract. These include resistance to bile salt and growth at low pH. Bacteria have developed various defense mechanisms, such as specific enzymes, exopolysaccharide production, against Gastrointestinal system, In our study, strains of lactic acid bacteria isolated from various fermented foods and plants and all the strains were determined of their bile salt and low pH resistance. The strains were also tested for their exopolysaccharide production and total cholesterol assimilation properties. EPS production was observed at rations between 11.9 to 1.1 mg/L, and total cholesterol assimilation percentages ranged from 60.71 to 16.71. There was no relevance between cholesterol assimilation ability and their EPS production.

Keywords: Cholesterol assimilation, exopolysaccharide, low pH, bile salt resistance.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*

✉ duygualp1@gmail.com

☎ (+90) 543 587 6811

☎ (+90) 246 211 1542

GİRİŞ

Kan dolaşımındaki yüksek kolesterol miktarı insanlarda kalp-damar sistemi hastalıkları için risk faktörü oluşturmaktadır. Kalp-damar sistemi hastalıkları, kanda aşırı kolesterol bulunması ile yakın ilişkili olan ve gelişmiş ülkelerdeki ölüm sebepleri içerisinde en yüksek orana sahip olanlardan birisidir (Ahn vd., 2003; Xie vd., 2011; Ahire vd., 2012; Castorena-Alba vd., 2017). Dünya sağlık örgütü (WHO), 2030 yılına kadar kardiyovasküler hastalıkların dünyada yaklaşık 23.6 milyon insanı etkileyen önemli bir ölüm nedeni olacağını öngörmektedir (Ahire vd., 2012; Alp ve Ertürkmen, 2017). Yüksek seviyede toplam kolesterol ve özellikle kabul edilir sınırların üzerinde olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol, hiperkolesterolemiye neden olmaktadır (Burhan vd., 2017). Vücudumuzda kolesterol sentez hızı ile kolesterol atılım hızı farklı olabilmektedir. Bu nedenle dengenin sağlanabilmesi için bazı düzenleyici mekanizmalar mevcuttur. Kolesterol vücudumuzdan iki şekilde atılmaktadır. İlk yol feçesle atılan safra asitlerine dönüştürülmesi şeklinde olup, ikinci yol ise safra içine salgılanarak atılabilmesi için bağırsaklara ulaştırılması şeklindedir (Ulukaya, 1997). Bu iki yoldan ikincisi olan yani, safra içerisine salgılanması şeklinde gerçekleşen yol kolesterolün, vücuttan atılması için izlenen en önemli yoldur. Serbest kolesterol, sulu çözeltilerde neredeyse hiç çözünmez, fakat safrada, safra asitleri ve lesitin gibi lipitler vasıtasıyla çözünebilir hale gelir (Tok, 2007). Safra asitleri çok basamaklı bir metabolik yol izleyerek karaciğer tarafından sentezlenirler. Oluşan bileşikler “primer” safra asitleri olarak adlandırılan kolik asit ve kenodeoksikolik asittir. *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* gibi bağırsak bakterileri glisin ve taurin aminoasitlerini safra tuzlarından, safra tuzu hidrolaz (BSH) enzimini kullanarak ayrırabilmektedirler. Bu olaya “dekonjugasyon” adı verilir (Ulukaya, 1997). Safra asitlerinin deterjan etkisi, konjuge safra tuzlarına kıyasla daha azdır. Bu nedenle dekonjuge olmuş (serbest) safra asitleri, kolesterolün emiliminde, konjuge safra tuzları kadar etkili değildirler. Bu sebepten dolayı safra tuzu dekonjugasyonunun, kolesterolün çözünürlüğünü azalttığı, dolayısıyla bağırsaklardan

emilimini ve ayrıca enterohepatik döngüyle karaciğere dönen safra asidi miktarını azalttığı bundan dolayı da, karaciğerdeki safra asidi üretimini arttırdığı düşünülmektedir (Hofmann vd., 1983; Gilliland vd., 1985; Ulukaya 1997; Ahn vd., 2003; Tok, 2007; Tok ve Aslım 2010; Anila vd., 2016). Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) probiyotik özellik gösterebilmesi için ağız yoluyla alındığında mide asitliği ve safraya karşı tolerans, safra tuzu hidrolaz aktivitesi, bağışıklık sistemi modülasyonu, patojenler ile rekabet gibi özelliklere sahip olması gerekmektedir (Ünal ve Erginkaya, 2010; Öztürk ve Tiryaki Gündüz, 2018). Ayrıca bazı probiyotik suşların kandaki yüksek kolesterol seviyesini düşürebilme yeteneklerinden dolayı son yıllarda bu amaçla kullanımları gündeme gelmiştir (Pinto vd., 2006; Tok, 2007; Moal ve Servin, 2014; Iranmanesh vd., 2014; Özden Tuncer ve Tuncer, 2014; Arief vd., 2015; Chang-Qing ve Rong 2015; Syah vd., 2017; Burhan vd., 2017). Çalışmalar, plazma kolesterolü ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü düşürmek için bazı kültürleri içeren süt ürünlerinin tüketiminin faydalı olabileceğini göstermiştir. İnsan, fare, domuz ve sığanlarda yapılan çalışmalar sonucu LAB'nin serum kolesterolünü azaltmada önemli bir etki gösterebileceği görülmüştür. Özellikle *Lactobacillus* cinsine ait bazı türlerin potansiyel hipokolesterolemik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle probiyotik içeren süt ürünlerinin tüketimi, serum kolesterolü düşürmek için tavsiye edilmektedir (Wang vd., 2014). Probiyotiklerin hangi mekanizma ile serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Düşünülen olası mekanizmalar arasında kolesterolün bakteri hücresi tarafından asimilasyonu, bakteriyel asit hidrolazlar ile safra asitlerinin dekonjugasyonu, kolesterolün bakteri duvarına bağlanması, hepatik kolesterol sentezinin inhibisyonu veya kolesterolün plazmadan karaciğere doğru yön değiştirmesi vardır (Noh vd., 1997; Kopp-Hoolihan vd., 2001; Kaur vd., 2002; Gill ve Guarner, 2004; Coşkun, 2006; Belviso vd., 2009;).

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada çeşitli fermente gıdalardan ve bitkilerden izole edilerek 16S rRNA dizi analizi ile

tür düzeyinde tanımlamaları yapılmış (GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi, Ankara) 15 adet laktik asit bakterisi kullanılmıştır (Alp, 2018).

İzolatların Safra Tuzu, Düşük pH Dayanımları

Denemeler MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe, Merck, Almanya) sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat geliştirilen bakteri kültürleri kullanılarak yapılmıştır. Gelişmenin ardından kültürler safra tuzuna karşı direnç özelliğinin belirlenmesi amacıyla % 1 oranında safra tuzu içeren Fosfat Tamponu Çözeltisi (PBS) içerisine % 1 oranında

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{Canlı kalan hücre sayısı (kob/mL)}}{\text{Başlangıçta inoküle edilen hücre sayısı (kob/mL)}} \times 100 \quad (1)$$

Kültürlerin düşük pH koşullarına dayanımlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan pH derecesi ve inkübasyon süresi, besinler insan sindirim sisteminden geçerken midede kalma süresi baz alınarak belirlenmiştir. Besinlerin genel olarak midede kalma süresi 3 saat olup bu süre içerisinde midenin pH'sı 1 ile 4 arasında değişmektedir (Vinderola vd., 2000). Bu amaçla kültürler, MRS sıvı besiyerinde 30°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra PBS tamponun pH'sı 3.0 olacak şekilde ayarlanmıştır. pH'sı ayarlanan PBS tampona aktif kültürlerden % 1 oranında aşularak, 37°C'de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun başlangıç, 1. ve 3. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyon sonrası damla kültür yöntemi ile MRS katı besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılarak değerler eşitlik (1)'e göre hesaplanmıştır (Eryılmaz, 2011; Horáčková vd., 2011; Sahadeva vd., 2011; Jamaly vd., 2011; Soliman vd., 2015).

İzolatların Ekzopolisakkarit Üretimleri

İzolatların farklı karbonhidrat kaynaklarını kullanarak ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi amacıyla MRS besiyeri modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla hem standart MRS besiyeri, hem de bileşiminde yer alan glukoz yerine fruktoz, laktöz ve sükroz % 2 olacak şekilde kullanılmıştır. Çalışma öncesinde EPS üreticisi olabilecek suşların belirlenmesi için kültürler önce

ilave edilmiştir. 37°C'de yapılan inkübasyonun başlangıç, 4. ve 24. saatlerinde örneklerden alınan numunelerin sayımları seri dilüsyonlar sonrası damla kültür yöntemi ile MRS katı besiyerlerine 3 paralel olacak şekilde yapılmıştır. 37°C'de 48 saat yapılan inkübasyonun ardından kontrol ve deneme gruplarındaki koloniler sayılarak değerler eşitlik (1)'e göre hesaplanmıştır (Eryılmaz, 2011; Horáčková vd., 2011; Sahadeva vd., 2011; Jamaly vd., 2011; Xiao vd., 2014; Tokatlı vd., 2015; Soliman vd., 2015).

farklı şekerler içeren MRS katı besiyerinde 30°C'de 3 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda mukoz yapıda koloni oluşturan izolatlar muhtemel ekzopolisakkarit üreticisi olarak seçilmişlerdir. Seçilen koloniler aynı şeker bileşiminde hazırlanmış MRS sıvı besiyerine alınarak tekrar 30°C'de 3 gün inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonun sonunda örnekler 10 dakika 100°C'de kaynatılmış, ardından 900µL % 85'lik TCA ve 900µL örnek olacak şekilde darası alınmış 2 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 10.000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatanttan 500 µL alınmış üzerine 1500 µL soğuk etanol eklenerek 1 gece -18°C'de bekletilmiştir. Daha sonra tekrar 10.000 rpm'de 25 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüj sonrası süpernatant dökülmüş etanolün uzaklaştırılması için 60°C'de 1 gece bekletilmiştir. Kurutulan tüpler sürenin sonunda tekrar tartılmış ve sonuçlar mg/L olacak şekilde hesaplanmıştır (Smitinont, vd., 1999; Feng vd., 2012). Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde Minitab versiyon 16 programı kullanılmıştır

İzolatların Kolesterol Asimilasyonu

İzolatların kolesterol asimilasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Anandharaj ve Sivasankari (2014) çalışmalarında kullandığı yöntem modifiye edilmiştir. MRS besiyeri % 0.3 safra tuzu (Merck) ve 110.70 mg/dL kolesterol (Sigma Aldrich) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Aktif kültürlerden % 1 oranında aşılama yapıldıktan sonra anaerob ortamda 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun sonunda izolatların MRS besiyerinde kalan toplam kolesterol miktarı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesinde Beckman Coulter AU5800 model analizör ile belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Safra Tuzuna Karşı Gelişim

Çalışmamızda 15 adet laktik asit bakterisinin % 1 safra tuzuna karşı 0., 4 ve 24 saat sonundaki

gelişimleri belirlenmiştir. % 1 safra tuzuna karşı 24 saat sonunda izolatların hepsi canlılıklarını korumuştur. Canlılık yüzdeleri % 104.23 ile % 88.73 arasındadır. Çizelge 1’de safra tuzuna karşı 0., 4. ve 24. saat sonundaki gelişen mikroorganizmaların logaritmik sonuçları, canlılık oranları ve izolasyon kaynakları verilmiştir.

Çizelge 1. İzolatların safra tuzunda 0., 4. ve 24. saat inkübasyon sonundaki canlılık oranları

Table 1. Viability of isolates at the end of 0,4 and 24 hours of incubation in bile salt solution

Mikroorganizma izolasyon kaynağı Isolation source of microorganism	Mikroorganizma Microorganism	0. h	4. h	24. h	0-4. h Canlılık Oranı (%) 0-4. h Viability Ratio (%)	0-24. h Canlılık Oranı (%) 0-24. h Viability Ratio (%)
Tulum Peyniri Tulum Cheese	<i>L. casei</i> DA4	7.50 ± 0.37	7.33 ± 0.59	7.22 ± 0.40	97.73 ± 3.96	96.26 ± 2.53
Bergama Tulumu Bergama Tulum Cheese	<i>W. cibaria</i> DA8	7.98 ± 0.40	7.61 ± 0.70	7.88 ± 0.44	95.36 ± 5.02	98.74 ± 2.75
Tulum Peyniri Tulum Cheese	<i>W. cibaria</i> DA28	7.34 ± 0.06	7.34 ± 0.13	7.26 ± 0.13	100.00 ± 1.36	98.91 ± 1.36
Turşu Pickle	<i>L. plantarum</i> DA100	7.05 ± 0.04	6.93 ± 0.24	6.81 ± 0.00	98.29 ± 1.77	96.59 ± 1.00
Beyaz Peynir White-Brined Cheese	<i>L. fermentum</i> DA134	8.49 ± 0.12	8.40 ± 0.52	8.40 ± 0.50	98.93 ± 3.38	98.93 ± 3.38
Ezine Peyniri Ezine Cheese	<i>L. plantarum</i> DA135	7.79 ± 0.50	7.33 ± 0.90	8.12 ± 0.47	94.09 ± 8.04	104.23 ± 2.95
Tulum Peyniri Tulum Cheese	<i>L. plantarum</i> DA140	7.18 ± 0.09	7.18 ± 0.16	7.12 ± 0.11	100.00 ± 1.45	99.16 ± 1.30
Fermente Sucuk Turkish Dry Fermented Sausage	<i>L. plantarum</i> DA199	8.25 ± 0.52	7.82 ± 0.43	7.88 ± 0.43	94.78 ± 2.75	95.51 ± 2.70
Fermente Sucuk Turkish Dry Fermented Sausage	<i>L. plantarum</i> Da218	7.69 ± 0.61	7.81 ± 0.18	7.51 ± 0.48	101.56 ± 1.54	97.65 ± 3.08
Fermente Sucuk Turkish Dry Fermented Sausage	<i>L. plantarum</i> DA225	7.85 ± 0.52	7.70 ± 0.28	7.90 ± 0.63	98.08 ± 1.93	100.63 ± 4.27
Zeytin Olive	<i>L. plantarum</i> DA245	8.11 ± 0.39	7.89 ± 0.18	7.61 ± 0.20	97.28 ± 5.38	93.83 ± 1.61
Kara Dut Black Mulberry	<i>L. plantarum</i> DA255	7.90 ± 0.53	7.61 ± 0.39	7.62 ± 0.51	96.32 ± 2.50	96.45 ± 3.29
Biberiye Rosemary	<i>L. coryniformis</i> DA256	7.41 ± 0.86	7.52 ± 0.30	7.52 ± 0.30	101.48 ± 2.03	101.48 ± 2.02
Turunç Bitter Orange	<i>L. coryniformis</i> DA263	7.36 ± 0.09	7.18 ± 0.02	7.22 ± 0.03	97.55 ± 1.05	98.09 ± 1.08
Yeni dünya Japanese Medlar	<i>L. lactis</i> DA268	8.17 ± 0.14	7.52 ± 0.23	7.25 ± 0.36	92.04 ± 1.71	88.73 ± 2.29

Eryılmaz, (2011) çalışmasında vajinal sekresyondan izole etmiş olduğu laktik asit bakterilerinin % 0.3 % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzuna karşı dirençliliğini tespit etmiştir. *L. brevis* OZV suşunun 4. saatte % 0.3'lük konsantrasyonda canlılık oranını % 95.98 olarak tespit etmiştir. Suş, % 0.5 ve % 1'lik konsantrasyonlarda da yine bu rakamlara

ulaşmıştır. Jamally vd. (2011) çalışmalarında Fas'a özgü süt ürünlerinden izole ettikleri *L. plantarum*, *L. paracasei* ve *L. brevis* suşlarının % 0.2, % 0.3, % 0.5 ve % 1 oranında safra tuzuna karşı 0., ve 24., saatlerdeki dirençliliklerini tespit etmiştir. İzolatlar % 0.2 ve % 0.3 safra tuzunda iyi gelişim gösterirken % 1 safra tuzuna karşı canlılık değerleri düşük çıkmıştır. İzolatların % 1 safra

tuzuna karşı en yüksek canlılık oranı % 65.20 olarak belirlenmiştir. Sharma vd. (2016) geleneksel süt ürünlerinden elde ettiği laktik asit bakterilerinin % 0.3, 0.7, 1.0, 1.5 ve % 2 safra tuzuna karşı 24. saat sonundaki dirençliliklerini tespit etmiştir. *L. casei* suşlarının bu oranların tamamında yaklaşık % 90-95 aralığında canlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Wang vd. (2014) hardaldan izole ettikleri 50 adet laktik asit bakterisinin % 0.5 ve % 1 safra tuzuna dirençlilik özelliklerini incelemişlerdir. Mikroorganizmalardan sadece *Lactobacillus* suşları safra tuzuna dirençlilik gösterebilmiştir. Anandharaj ve Sivasankari (2014) yaptıkları çalışmada *Lactobacillus* ve *Weissella* suşlarının % 0.3 ve % 0.5 oranında safra tuzuna karşı dirençliliğini tespit etmişlerdir. % 0.3'lük safra tuzunda *Lactobacillus* suşları ortalama % 81 *Weissella* suşları ise % 84 oranında canlılık göstermişlerdir. % 0.5'lik safra tuzunda ise bu oranlar % 30'lara kadar inmiştir. Uraipan ve Hongpattarakere (2015) çalışmalarında laktik asit bakterileri ve bifidobakterlerin gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı antogonistik etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla izolatların % 0.3 safra tuzuna karşı direncini incelemişlerdir. Suşlardan en iyi canlılığı *B. longum* NIF7AN2 % 95.80, *L. plantarum* CIF17AN8 % 80.03 olarak göstermiştir. Yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak % 0.3 ve % 0.5 oranında safra tuzu ile çalışıldığı görülmüştür.

Çalışmamızda ise % 1 oranında safra tuzu ile deneme yapılmıştır. Çalışmada mikroorganizmaların vücudumuzda gelişmelerini destekleyici herhangi bir ortam olmadan safra tuzları ile karşılaştıkları düşünülerek zengin besin içeriği ve tamponlama özelliği olan MRS besiyeri yerine PBS'de yapılmış ve bu durum göz önüne alındığında elde edilen sonuçların iyi bir canlılık oranı olduğu düşünülmüştür.

Düşük pH'da Gelişim

Mide pH'sı 1-4 arasında değişmektedir ve besinler midede en az 90 dakika kalmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların uygulanan pH ve süreye dayanıp dayanamadıklarını belirleyebilmek amacıyla *in vitro* tolerans testleri uygulanmaktadır (Castorena-Alba vd., 2017). Çalışmamızda da bu amaçla 15 adet laktik asit bakterisinin pH 3.0'de 0., 1. ve 3. saatlerdeki canlılık oranları belirlenmiştir. Asit direnci suşlar arasında farklılık göstermiş ve 8 adet izolat 3. saatin sonunda canlılığını yitirmiştir. Suşlar arasında farklı illerden alınmış tulum peynirinden izole edilen *W. cibaria* DA8 ve *W. cibaria* DA28 suşları 3. saatin sonunda oldukça iyi bir canlılık yüzdesi göstermişlerdir. 3. saatin sonunda canlılığını koruyan diğer bir grup ise fermente sucuk izolatları olan *L. plantarum* DA199, *L. plantarum* DA218 ve *L. plantarum* DA225'dir. Çizelge 2'de Mikroorganizmaların pH 3.0'e karşı 0., 1. ve 3. saat sonundaki gelişme durumları ve canlılık oranları verilmiştir.

Çizelge 2. Mikroorganizmaların pH 3.0'e karşı canlılık sonuçları
Table 2. The viability results of microorganisms against pH 3.0

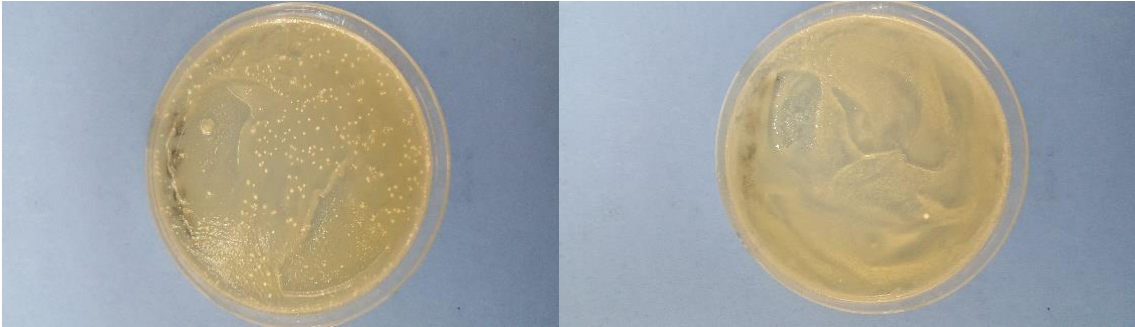
Mikroorganizma Microorganism	0. h	1. h	3. h	0-1. h Canlılık (%) 0-1. h Viability (%)	0-3. h Canlılık (%) 0-3. h Viability (%)
<i>L. casei</i> DA4	7.20 ± 0.26	6.91 ± 0.37	7.13 ± 0.65	95.97 ± 2.33	99.02 ± 4.48
<i>W. cibaria</i> DA8	7.03 ± 0.49	7.57 ± 0.11	7.50 ± 0.82	107.68 ± 1.30	106.68 ± 6.61
<i>W. cibaria</i> DA28	8.28 ± 0.39	7.91 ± 0.50	8.35 ± 0.51	95.53 ± 3.17	100.84 ± 3.26
<i>L. plantarum</i> DA100	8.42 ± 0.33	7.49 ± 0.43	0.00	88.95 ± 2.69	0.00
<i>L. fermentum</i> DA134	8.50 ± 0.46	5.73 ± 0.20	4.55 ± 0.02	67.41 ± 1.57	53.52 ± 1.05
<i>L. plantarum</i> DA135	8.13 ± 0.31	7.68 ± 0.33	0.00	94.46 ± 2.12	0.00
<i>L. plantarum</i> DA140	8.02 ± 0.23	5.06 ± 0.10	0.00	63.92 ± 1.27	0.00
<i>L. plantarum</i> DA199	8.32 ± 0.50	8.18 ± 0.42	8.04 ± 0.40	98.31 ± 2.61	96.63 ± 2.54
<i>L. plantarum</i> DA218	8.32 ± 0.22	7.90 ± 0.27	6.74 ± 0.23	94.95 ± 1.84	81.00 ± 1.68
<i>L. plantarum</i> DA225	8.69 ± 0.34	7.84 ± 0.28	6.54 ± 0.21	90.21 ± 1.92	75.25 ± 1.63
<i>L. plantarum</i> DA245	8.59 ± 0.27	7.96 ± 0.14	0.00	92.66 ± 1.38	0.00
<i>L. plantarum</i> DA255	7.63 ± 0.47	7.60 ± 0.14	0.00	72.08 ± 1.38	0.00
<i>L. coryniformis</i> DA256	8.19 ± 0.02	7.04 ± 0.34	0.00	85.95 ± 2.18	0.00
<i>L. coryniformis</i> DA263	7.83 ± 0.16	7.60 ± 0.00	0.00	97.06 ± 1.00	0.00
<i>L. lactis</i> DA268	8.12 ± 0.18	0.00	0.00	0.00	0.00

Horáčková vd. (2011) çalışmalarında farklı *Lactobacillus* şuşlarının gastrointestinal sistemdeki canlılıklarını belirlemişlerdir. Düşük pH'ya karşı dayanım testinde sindirim koşullarını oluşturmak için pH 2.0'de 0., 2., ve 3. saatlerde canlılık tespiti yapmışlardır. Mikroorganizmalar 3. saatin sonunda ortalama 1-2 logaritma düzeyinde düşüş göstermişlerdir. Soliman vd. (2015) *L. acidophilus*, *L. casei* ve *L. plantarum* şuşlarının probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla pH 2.0 ve pH 3.0'de canlılıklarını belirlemişlerdir. *L. acidophilus* pH 2.0'de canlılık gösterebilirken diğer iki mikroorganizma bu asit değerinde canlı kalamamışlardır. Dixit vd. (2013) üç farklı *L. acidophilus* şuşunun probiyotik olma özelliklerini incelemişlerdir. Bu amaçla yaptıkları düşük asite

direnç testinde MRS besiyerinin pH'sını 2.5'e ayarlamış ve 2. ve 4. saatlerdeki canlılıklarını belirlemişlerdir. Şuşlar pH 2.5'de 4 saat sonunda % 34, % 52 ve % 75 oranında canlılık göstermişlerdir.

Ekzopolisakkarit Üretimi

Ekzopolisakkarit üretimini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonucunda 15 adet izolattan 9 tanesi sakkaroz içeren MRS katı besiyerinde parlak, mukoz bir yapı üretmişlerdir. Şekil 1'de *L. plantarum* DA255 ve *L. coryniformis* DA263 izolatlarının sakkaroz içeren MRS katı besiyerinde oluşturdukları parlak, mukoz yapı gösterilmektedir.



Şekil 1. *L. plantarum* DA255 ve *L. coryniformis* DA263 şuşlarının oluşturduğu parlak, mukoz yapı
Figure 1. Glossy, mucous structure of *L. plantarum* DA255 and *L. coryniformis* DA263

İzolatların ürettiği EPS miktarı 11.9 ile 1.1 mg/L arasında belirlenmiştir. Dut bitkisinden izole edilen *L. plantarum* DA255 şuşu 11.9 mg/L ile en yüksek EPS üreticisi olarak belirlenmiştir. Ardından turşudan izole edilen *L. plantarum* DA100 izolatu 9 mg/L verirken en düşük miktar beyaz peynirden izole edilen *L. fermentum* DA134 şuşunda 1.1 mg/L olarak belirlenmiştir. Aşağıda çizelgede (Çizelge 3) izolatların EPS miktarları mg/L olarak verilmiştir.

Feng vd. (2012) çalışmasında Çin'e özel çeşitli geleneksel fermente gıdalardan izole edilen laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit (EPS) üretimlerini belirlemişlerdir. En yüksek EPS üretim kapasitesi (0.859 g/L) *L. plantarum* (HQ259238) şuşundan elde etmişlerdir. Van Geel-Schutten vd. (1998) çalışmalarında 182 adet *Lactobacillus* şuşundan 60 tanesinin EPS ürettiğini,

bunlardan 17 şuşun EPS üretiminin 100 mg/L'den fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışma sonunda EPS üretimi için en uygun bileşenin sakkaroz olduğunu kaydetmişlerdir. Dilna vd. (2015) çalışmasında laktik asit bakterilerinin uygun koşullar sağlandığında EPS üretimi için yararlı olacağını düşünmüşlerdir. Bu amaçla yaptıkları çalışmada *L. plantarum* RJF4, şuşu, yapısında glukoz ve mannoz içeren bir heteropolisakkariti 3.5 g/L düzeyinde üretmiştir. Wang vd. (2015) çalışmasında kefirde izole ettikleri *L. plantarum* YW32 şuşunun EPS üretimini ve yapısını belirlemişlerdir. *L. plantarum* YW32 tarafından üretilen EPS, yaklaşık sırasıyla 8.2:1: 4.1:4.2'lik mol oranında mannoz, fruktoz, galaktoz ve glukozdan oluşmuştur. Ayrıca oluşan EPS'nin 1.03×10^5 Da'lık bir molekül ağırlığına sahip olduğunu belirlemişlerdir. Üretilen EPS'nin yüksek sıcaklığa (283.5°C), ksidroksil ve

süperoksit radikallerine karşı antioksidan aktiviteye ve bazı patojen bakteriler üzerinde antibiyofilm aktivitesi ile insan HT-29 hücrelerine karşı antitümör aktivitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Demir vd. (2017) yoğurttan izole ettikleri laktik asit bakterilerinin EPS üretimlerini belirlemişler ve bakterilerin EPS üretim miktarları 5.89 ile 134.60 mg/L arasında tespit etmişlerdir.

Çizelge 3. İzolatların ürettiği EPS miktarları (mg/L)

Mikroorganizma <i>Microorganism</i>	EPS miktarı (mg/L) <i>EPS amount (mg/L)</i>
<i>W. cibaria</i> DA8	2.95 ^{bc}
<i>W. cibaria</i> DA28	2.40 ^{bc}
<i>L. plantarum</i> DA100	9.00 ^{ab}
<i>L. fermentum</i> DA134	1.10 ^c
<i>L. plantarum</i> DA140	2.40 ^{bc}
<i>L. plantarum</i> DA199	2.80 ^{bc}
<i>L. plantarum</i> DA245	5.00 ^{abc}
<i>L. plantarum</i> DA255	11.90 ^a
<i>L. coryniformis</i> DA263	4.90 ^{abc}

^{a, b, c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.05$) ^{a, b, c} Different letters in same column are statistically different ($P < 0.05$).

Kolesterol Asimilasyonu

Bazı laktobasil veya bifidobakterleri içeren fermente süt ürünlerinin tüketilmesinin, insanlarda serum kolesterol düzeylerini düşürdüğü iddia edilmektedir (Burhan vd., 2017). Çalışmamızda da probiyotik olma potansiyeline sahip olduğu düşünülen 15 adet laktik asit bakterisinin kolesterol asimilasyon yetenekleri belirlenmiştir. İzolatların toplam kolesterol asimilasyon yüzdeleri % 60.71 ile % 16.71 arasında değişmektedir. EPS üreticisi olmayan *L. lactis* DA268 % 60.71 ile en yüksek asimilasyonu sağlamıştır. *L. plantarum* DA245 suşu ise iyi bir EPS üreticisi olmasına karşın kolesterol asimilasyon yüzdesi % 16.71 olarak bulunmuştur. Çizelge 4'te izolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri ve miktarları verilmiştir. Anandharaj ve Sivasankari (2014) çalışmalarında anne sütünden izole ettikleri *Lactobacillus* suşlarının farklı

kolesterol miktarlarında ve safra tuzu varlığında/yokluğunda asimilasyon özelliklerini belirlemişlerdir. Suşlar safra tuzu yokluğunda 23.28-35.41 mg/mL aralığında kolesterol asimile ederken % 0.3 safra tuzu varlığında en yüksek değer 61.05 mg/mL olarak belirlenmiştir. Burhan vd. (2017) 6 farklı *L. fermentum* suşunun kolesterol asimilasyon yeteneğini belirlemişlerdir. Suşlar 100 mg/mL toplam kolesterol bulunan MRS besiyerine 10^{10} kob/mL olacak şekilde aşılınmış ve 24 saat anaerobik koşullarda inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonunda suşlar % 4.1 ve % 8.1 oranında asimilasyon göstermişlerdir. Castorena-Alba vd. (2017) çalışmasında farklı laktobasil ve bifidobakter suşlarının % 0.2 ve % 0.4 safra tuzu varlığındaki kolesterol asimilasyon yeteneklerini belirlemişlerdir. *B. lactis* DSM10140 suşu % 0.2 safra tuzu varlığında % 0.08 asimilasyon gösterirken % 0.4 safra tuzu varlığında bu yüzde % 18.69 olmuştur. Lertcanawanichakul vd. (2015) *P. plantarum* L14/1, *P. acidilactici* L25, *L. plantarum* L26, *L. Pentosus*, *E. faecium* N 15, suşlarının kolesterol asimilasyon özelliklerini belirlemişlerdir. Suşlar % 0.3 safra tuzu varlığında iyi bir düşüş göstermişlerdir. *E. faecium* N 15 suşu safra tuzu varlığında % 64.88 düşüş sağlarken safra tuzu yokluğunda bu oran % 17.12'ye düşmüştür. Safra asitleri yüzey gerilimini azaltıcı etkileri ile suda çözünmeyen lipidlerin emülsiyonlaşmasını böylece enzimlerin bağırsak lümenindeki lipitlere daha iyi etki yapmalarının yanı sıra safra içerisindeki kolesterolün çökmesini engellerler. Bu nedenle yapılan çoğu *in vitro* kolesterol asimilasyon çalışmalarında safra tuzu ortama eklenerek etkisi incelenmektedir. Bu nedenle çalışmamızda yapılan kolesterol asimilasyon denemesinde MRS besiyeri içerisine 110.70 mg/dL kolesterolün yanı sıra % 0.3 safra tuzu eklenmiştir. 18 saat inkübasyon sonunda belli bir miktar kolesterol oluşan pH değişimi ile çökmüş olma ihtimali de bulunmaktadır. Ancak elde edilen asimilasyon yüzdeleri suşların bu yetenekleri hakkında öngörü sahibi olmamıza katkıda bulunmuştur.

Çizelge 4. İzolatların kolesterol asimilasyon yüzdeleri

Table 4. Cholesterol assimilation percentages of isolates

Mikroorganizma Microorganism	Total Kolesterol Asimilasyonu (%) Total Cholesterol Assimilation (%)
<i>L. casei</i> DA4	16.91
<i>W. cibaria</i> DA8	32.15
<i>W. cibaria</i> DA28	36.31
<i>L. plantarum</i> DA100	34.14
<i>L. fermentum</i> DA134	33.51
<i>L. plantarum</i> DA135	30.50
<i>L. plantarum</i> DA140	43.27
<i>L. plantarum</i> DA199	42.18
<i>L. plantarum</i> Da218	50.63
<i>L. plantarum</i> DA225	55.50
<i>L. plantarum</i> DA245	16.71
<i>L. plantarum</i> DA255	41.19
<i>L. coryniformis</i> DA256	50.52
<i>L. coryniformis</i> DA263	36.22
<i>L. lactis</i> DA268	60.71

SONUÇ

Mikroorganizmaların, gastrointestinal sistemden rahatça geçebilmesi için safra tuzuna ve düşük pH'ya karşı dirençli olmaları gerekmektedir. Mide pH'sı 1-4 arasında değişmekte ve besinlerin midede kalma süresi ortalama 3 saattir. Bu nedenle çalışmamızda pH 3.0'de 0., 1., ve 3. saatlerde mikroorganizmaların canlılık miktarları belirlenmiştir. 15 izolattan 7 tanesi 3. saatin sonunda canlı kalmayı başarabilmişlerdir. % 1 safra tuzu denemesinde ise izolatların tamamı 24 saat sonunda yüksek bir canlılık oranı göstermişlerdir. Alp ve Aslım (2010) çalışmasında anne sütü ile beslenen bebeklerin dışkılarından izole ettikleri 31 *Bifidobacterium* spp.'nin safra tuzlarına ve düşük pH'ya karşı direnç ile ekzopolisakkarit üretimlerini belirlemiş ve EPS üretimi ile safra tuzlarına karşı direnç ve düşük pH'ya karşı direnç arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır ($p < 0.01$). EPS üreticisi bazı laktobasil suşlarının safra tuzlarının da yardımı ile kolesterolü asimile edebildiği birçok *in vitro* çalışma ile gösterilmiştir (Horáčková vd., 2017). Tok ve Aslım (2010) çalışmalarında yüksek EPS üretimi olan suşların daha iyi bir kolesterol asimilasyonu sağladığını belirlemişlerdir. Ancak

bizim çalışmamızda EPS üretimi ile kolesterol asimilasyonları arasında kuvvetli bir bağlantı bulunamamıştır. Yüksek miktarda EPS üretimi olan *L. plantarum* DA255 suşu % 41.19 oranında kolesterol asimilasyonu gösterirken *L. lactis* DA268 suşu EPS üreticisi olmamasına rağmen % 60.71'lik bir kolesterol asimilasyonu göstermiştir. Bu durum izolatların kolesterol asimilasyonunu EPS üretiminden farklı mekanizmalar ile sağladığı sonucunu düşündürmektedir. Laboratuvar ortamında yapılan deneme sonuçları ile suşların *in vivo* ortamda gösterebilecekleri kolesterol asimilasyon yetenekleri hakkında öngörü sahibi olunmuştur. Ancak bu suşların safra tuzu hidrolaz, HMG CoA redüktaz enzimi aktivitesi gibi bazı özellikleri, kolesterol seviyesini düşürdüğü mekanizma (mekanizmalar) ve uygun suşları seçmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No:4439-D1-15) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Ahire, J., Bhat, A., Thakare, J., M., Pawar, P., B., Zope, D., G., Jain, R., M., Chaudhari, B. L. (2012). Cholesterol assimilation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Lett*, 34: 103–107, doi: 10.1007/s10529-011-0733-2.

Ahn, Y., T., Kim, G., B., Lim, K., S., Baek, Y., J., Kim, H.U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *Int Dairy J*, 13: 303–311, doi: 10.1016/S0958-6946(02)00174-7.

Alp, D. (2018). Doğal kaynaklardan izole edilen laktik asit bakterilerinin bazı probiyotik özelliklerinin araştırılması ve *in vitro* bağırsak modelinde patojenlerin tutunmasını engelleme özelliklerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Isparta, Türkiye, 124 s.

Alp, D., Ertürkmen, P. (2017). Probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus* spp. suşlarının kolesterol düşürücü etkileri ve olası mekanizmalar. *Makü Febed*, 8(1): 108-113.

- Alp, G., Aslım, B. (2010). Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (eps) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe*, 16: 101–105.
- Anandharaj, M., Sivasankari, B. (2014). Isolation of potential probiotic *Lactobacillus* oris HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *J Biosci Bioeng*, 118 (2): 153-159, doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.01.015.
- Anila, K., Kunzes, A., Bhalla, T.C. (2016). *In vitro* cholesterol assimilation and functional enzymatic activities of putative probiotic *Lactobacillus* ssp. isolated from fermented foods/beverages of North West India. *J Nutr Food Sci*, 6 (2), doi:10.4172/2155-9600.1000467.
- Arief, I.I., Jenie, B.S., Astawan, M., Kazuhito, F., Witarto, A.B. (2015). Identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian local beef. *Asian-Australas J Anim Sci*, 9(1): 25-36, doi:10.3923/ajas.2015.25.36.
- Belviso, S., Giordano, M., Zeppa, P.D.G. (2009). *In vitro* cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian Castelmagno PDO Cheese. *Dairy Sci Technol*, 89: 169–176, doi: 10.1051/dst/2009004.
- Burhan, H.S.A., Priyambada, E., Arief, I.I. (2017). Potential of lactic acid bacteria isolated from Dangke and Indonesian Beef as Hypocholesterolaemic Agent. *J Anim Sci Technol*, 40 (2):136-142, doi: 10.5398/medpet.2017.40.2.136.
- Castorena Alba, M.M., Vázquez Rodríguez, J.A., López Cabanillas Lomelí, M., González Martínez, B.E. (2017). Cholesterol assimilation, acid and bile survival of probiotic bacteria isolated from food and reference strains. *CyTA*, 1(16):36–41, doi: 10.1080/19476337.2017.1335347.
- Chang Qing, Y., Li Rong, L. (2015). Cloning and expression of bile salt hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* M1-Uvs29, (Eng. ed.) Volume 2, *J Northeast Agric Univ*, 60-66.
- Coşkun, T. (2006). Pro-pre ve sinbiyotikler. *CŞHD*, 49: 128-148.
- Demir, E., Kaygusuz, E., Kılıç, G., Yüce, S., Soyuçok, A. (2017). Yoğurt örneklerinden izole edilmiş laktik asit bakterilerinin moleküler yöntemlerle tanımlanması ve ekzopolisakkarit üretimlerinin belirlenmesi. *Makü Febed*, 8(1): 262-267.
- Dilna, S.V., Surya, H., Aswathy, R.G., Varsha, K.K., Sakthikumar, D.N., Pandey, A., Nampoothiri, K.M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *Food Sci Technol Int*, 64: 1179-1186, doi:10.1016/j.lwt.2015.07.040.
- Dixit, G., Samarth, D., Bhadekar, R. (2013). Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains. *Eurasia J Biosci*, 7: 1-9, doi: 10.5053/ejobios.2013.7.0.1.
- Eryılmaz, F. (2011). Vajinal Sekresyondan izole edilen laktik asit bakterilerine ait bazı suşların potansiyel probiyotik özelliklerin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, Türkiye, 95 s.
- Feng, M., Chen, X., Li, C., Nurgul, R., Dong, M. (2012). Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharide. *J Food Sci*, 77:(6)11-117, doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02734.x.
- Gill, H.S., Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J*, 80:516-526, doi: 10.1136/pgmj.2003.008664.
- Gilliland, S.E., Nelson, C.R., Maxwell, C. (1985): Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 49: 377.
- Hofmann, A.F., Molino, G., Milanese, M., Belforte, G. (1983). Description and simulation of a physiological pharmacokinetic model for the metabolism and enterohepatic circulation of bile acids in man compartmental model of cholic acid in man. *Eur J Clin Invest* 71: 1003-1022.
- Horáčková, S., Plocková, M., Demnerová, K. (2017). Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol

- reduction. *Biotechnol*, 36:(3)682-690, doi:10.1016/J.Biotechadv.2017.12.005.
- Horáčková, S., Žaludová, K., Plocková, M. (2011). Stability of selected *Lactobacilli* in the conditions simulating those in the gastrointestinal tract czech. *Czech J Food Sci*, 29: 30–35.
- Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N. (2014). Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *Food Sci Technol Int*, 58: 355-359, doi: 10.1016/j.lwt.2013.10.005.
- Jamaly, N., Benjouad, A., Bouksaim, M. (2011). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional moroccan dairy products. *Br Microbiol Res J*, 1(4): 79–94.
- Kaur, I., P., Chopra, K., Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci*, 15: 1–9, doi: 10.1016/S0928-0987(01)00209-3.
- Kopp Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc*, 101: 229-241, doi: 10.1016/S0002-8223(01)00060-8.
- Lertcanawanichakul, M., Kannai, J., Wongmuang, P., Tharaporn, S. (2015). Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria with potential probiotic properties. *Int J Pharmtech Res*, 7(3): 463-470.
- Moal, V.L., Servin, A.L. (2014). Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin Microbiol Rev*, 27(2): 167–199, doi: 10.1128/CMR.00080-13.
- Noh, D.O., Kim, S.H., Gilliland, S.E. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci*. 80:(12) 3107-3113.
- Öztürk, Z., Tiryaki Gündüz, G. (2017). Gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonunda probiyotik mikroorganizmaların kullanımı. *GIDA*, 43 (4): 533-548, doi: 10.15237/gida.GD17112.
- Pinto, M.G.V., Franz, C.M.A.P., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. (2006). *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int J Food Microbiol*, 109:205–214, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029.
- Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W., Chan, H.K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to ph and bile. *Int Food Res J*, 18(4):1515–1522.
- Sharma, K., Sharma, N., Sharma, R. (2016). Identification and evaluation of *in vitro* probiotic attributes of novel and potential strains of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products of North-West Himalayas. *J Clin Microbiol Biochem Technol* 2(1): 018–025, doi: 10.17352/jcmbt.000011.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, T., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P. (1999). Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int J Food Microbiol*, 51:105–111, doi: 10.1016/S0168-1605(99)00094-X.
- Soliman A.H.S., Sharoba, A.M., Bahlol, H.E.M., Soliman, A.S., Radi, O.M.M. (2015). Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. *JMEAST*, 5:(1) 10–18.
- Syah, S.P., Sumantri, C., Arief, I.I., Taufik, E. (2017). Isolation and identification of indigenous lactic acid bacteria by sequencing the 16S rRNA from Dangke, a traditional cheese from Enrekang, South Sulawesi. *Pak. J. Nutr*, 16(5):384-392. doi: 10.3923/pjn.2017.384.392.
- Tok, E. (2007). Probiyotik olarak kullanılabilircek bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol giderimi özellikleri ve safra tuzu dekonjugasyonu etkilerinin araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 95s.
- Tok, E., Aslım, B. (2010). Cholesterol removal by some lactic acid bacteria that can be used as probiotic. *Microbiol Immunol*, 54: 257–264, doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00219.x.

- Tokatlı, M., Gülgör, G., Elmacı, S., Arslanköz, N., Özçelik, F. (2015). *In vitro* properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles *BioMed Res Int.* ID 315819. s 8, doi: 10.1155/2015/315819.
- Özden Tuncer, B., Tuncer, Y. (2014). Exopolysaccharide producer *Streptococcus thermophilus* St8.01 strain; a potential probiotic culture. *GIDA* 39 (4):195-202.
- Ulukaya, E. (çeviri ed.) 1997. *Biyokimya. Biochemistry.* 2. baskıdan çeviri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye. 205.
- Uraipan, S., Hongpattarakere, T. (2015). Antagonistic characteristics against food-borne pathogenic bacteria of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from feces of healthy thai infants. *Jundishapur J Microbiol*, 8(6):18264, doi: 10.5812/jjm.8(6)2015.18264.
- Ünal, E., Erginkaya, Z. (2010). Probiyotik mikroorganizmaların mikroenkapsülasyonu. *GIDA*. 35 (4): 297-304.
- Van Geel-Schutten, G.H., Flesch, F., Brink, B., Smith, M.R., Dijkhuizen, L. (1998). screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50: 697-703.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. (2000). Viability of probiotic *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. *J Dairy Sci*, 83: 1905-1911, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(00)75065-X.
- Wang, S.C., Chang, C.K., Chan, S.C., Shieh, J.S., Chiu, C.K., Duh, P. (2014). Effects of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on lowering cholesterol. *Asian Pac J Trop Biomed*, 4(7): 523-528, doi: 10.12980/APJTB.4.201414B54.
- Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., Yang, Y., Yang, Z. (2015). Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr Polym*, 125: 16–25, doi: 10.1016/j.jbiomac.2014.12.006.
- Xiao, K. (2014). Bile resistance in *Lactobacillus rhamnosus* GG: Stability and mechanisms. Master Dissertation, Helsinki University, Finland, 72p.
- Xie, N., Cui, Y., Yin, Y.N., Zhao, X., Yang, W., Wang, Z., Fu, F., Tang, Y., Wang, X., Liu, X., Wang, C., Lu, F. (2011). Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complement Altern Med*, 11:53.

ET VE ET ÜRÜNLERİNDE MİKROBİYAL DEKONTAMİNASYON İÇİN BAZI ISIL OLMAYAN TEKNOLOJİLERİN KULLANIMI

Damla Bilecen Şen^{1*}, Birol Kılıç², Ebru Demir³, Gülden Başıyğıt Kılıç¹

¹Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, Türkiye

³Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

Geliş / Received: 04.09.2018; Kabul / Accepted: 09.02.2019; Online baskı / Published online: 01.03.2019

Bilecen Şen, D., Kılıç, B., Demir, E., Başıyğıt Kılıç, G. (2019). Et ve et ürünlerinde mikrobiyal dekontaminasyon için bazı ısı olmayan teknolojilerin kullanımı. GIDA (2019) 44 (2): 202-215 doi: 10.15237/gida.GD18099

Bilecen Şen, D., Kılıç, B., Demir, E., Başıyğıt Kılıç, G. (2019). Applications of some non-thermal technologies for microbial decontamination in meat and meat products. GIDA (2019) 44 (2): 202-215 doi: 10.15237/gida.GD18099

ÖZ

Günümüzde nüfusun beslenme düzeyi kalkınmanın önemli ölçütlerinden biri olarak sayılmakta ve bu nedenle nüfusun sağlıklı ve dengeli beslenebilmesi açısından et ve et ürünlerinin kalitesinin ve güvenliğinin iyileştirilmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle et ve et ürünleri muhafazasında çeşitli ısı işlem uygulamaları kullanılarak, gıdaların raf ömrü uzatılmakta ve mikrobiyal açıdan güvenlik sağlanmaktadır. Ancak bu teknolojinin uygulanması et ve et ürünlerinin fiziksel ve kimyasal yapılarında değişimlere, organoleptik özelliklerinin ve doğal bileşenlerinin bozulmasına neden olmaktadır. Bu nedenle et ve et ürünlerinin muhafazasında ısı olmayan teknolojiler üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu derleme ile et ve et ürünlerindeki mikroorganizmaların dekontaminasyonunda kullanılan ışınlama, ultraviyole ışınları, vurgulu elektrik alan, atımlı ışık, yüksek basınç ve ultrasonik ses dalgaları gibi ısı olmayan teknolojilerin özellikleri, uygulamaları ve oluşturduğu etkiler hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyal dekontaminasyon, ısı olmayan teknolojiler, et ve et ürünleri

APPLICATIONS OF SOME NON-THERMAL TECHNOLOGIES FOR MICROBIAL DECONTAMINATION IN MEAT AND MEAT PRODUCTS

ABSTRACT

Nowadays, the quality of nutrition level is regarded as one of the most important criteria showing social development level. Therefore, it is important to increase the safety and quality of meat and meat products in order to provide healthy and balanced nutrition. Thus, heat treatment applications have been commonly used for preservation of meat and meat products, and this process provides improved shelf life and microbial safety. However, this technology causes changes in physical and chemical structure, organoleptic characteristics, and natural components of meat and meat products. Therefore, many research about non-thermal technologies has been conducted on muscle foods. This review aims to describe the basic principles, applications and effects of non-thermal technologies including irradiation, ultraviolet light, pulsed electric fields, pulsed light, high hydrostatic pressure and ultrasound used for microbial decontamination of meat and meat products.

Keywords: Microbial decontamination, non-thermal methods, meat and meat products

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author:

✉ dbilecen@mehmetakif.edu.tr

☎ (+90) 248 213 2728

☎ (+90) 248 213 2704

GİRİŞ

Et ve et ürünleri yüksek sindirilebilirlik özelliği ile karakterize edilen zengin besin öğeleridir ve mikroorganizmaların gelişip çoğalabilmeleri için uygun ortamlardır. Et ürünleri; yüksek nem içerikleri, omega-3 yağ asitleri, vitamin B12, protein, mineral ve diğer gelişme faktörlerince zengin olmalarının yanı sıra belirli oranda fermente olabilir karbonhidrat içermeleri ve pH değerlerinin yüksek olması nedeniyle uygun olmayan depolama koşullarında kolayca bozulabilmektedir (Zhou vd., 2010).

Et ürünlerinde görülen en önemli bozulma türlerinden biri mikrobiyolojik bozulmalardır. Et yüzeyinde bulunan mikroorganizmaların etkinliği, kesimden hemen sonra başlamakta ve uygun olmayan işleme ve muhafaza şartlarında artarak, önemli sayılara ulaşabilmektedir. Gıdaların Mikrobiyolojik Özellikleri Uluslararası Komisyonu (International Commission on Microbiological Specifications for Foods-ICMSF)'na göre, kesilen etlerdeki toplam mikroorganizma veya toplam mikrobiyal yük için sınır değer 10^7 log KOB/g'dır (ICMSF, 1986). Ürünlerde bulunan yüksek sayıdaki mikroorganizmalar; istenmeyen tat ve koku değişimine, yapışkan madde üretimine neden olduğu için ürünlerin duyuşal özelliklerinde de kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle mikroorganizmaların kontrolü, gıda kalite ve güvenilirliği bakımından oldukça önemlidir. Gıda endüstrisinde kullanılan gıda muhafaza yöntemleri genellikle mikroorganizmaların gelişmesini engellemek ya da mikrobiyal inaktivasyonu sağlamak amacıyla yapılmaktadır (Horita vd., 2018).

Gıda muhafazasında ısıl işlem uygulamalarının mikroorganizmaları ve enzimleri inaktive etmesi sebebiyle yaygın bir kullanım alanı vardır. Ancak bu teknolojinin uygulanması sonucunda gıdaların fiziksel ve kimyasal yapılarında değişimler, duyuşal özelliklerinde ve doğal bileşenlerinde bozulmalar görülmektedir. Bu nedenle gıdaların muhafazasında ısıl olmayan teknolojiler üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Li ve Farid, 2016).

Et ve et ürünleri ile sıklıkla ilişkilendirilen mikroorganizmalar enteropatojenik *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* türleri, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* serotipleri, *Staphylococcus aureus* ve *Yersinia enterocolitica* iken, bu ürünler ile ilişkilendirilen parazit çeşitleri ise *Cysticercus bovis* ve *Taenia saginata*'dır (Dupuy vd., 2014; Lin vd., 2014). Son yıllarda bu patojen mikroorganizmaların dekontaminasyonunda ısıl olmayan teknolojilerin kullanıldığı görülmektedir. Uygulanan bu yöntemlerin etkinliği; etin başlangıçtaki mikrobiyal yükü, işleneceği ürünün özellikleri ve işleme şekli gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Doğu ve Sarıçoban, 2014).

Bu derleme makalede et ve et ürünlerindeki bazı patojen ve bozulma etmeni olan mikroorganizmaların dekontaminasyonunda kullanılan iyonize ışınlama (İİ), ultraviyole ışın (UV), vurgulu elektrik alan (VEA), atımlı ışık (AI), yüksek basınç (YB) ve ultrasonik ses (US) dalgaları gibi ısıl olmayan bazı teknolojilerin özellikleri, uygulama alanları ve oluşturduğu etkileri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

ISIL OLMAYAN YÖNTEMLER

İyonize Işınlama (İİ)

Mikroorganizmaların DNA'sını tahrip ederek mikrobiyal faaliyetleri sınırlandıran bir yöntem olan İİ, gıda kaynaklı hastalıklara sebep olan patojenleri inaktive ederek, gıdaların güvenilirliğini arttırmaktadır (Nagarajarao vd., 2016). Işınlama tekniği; ışınlamaya maruz bırakılan gıdanın sıcaklığında önemli bir artış olmamasından dolayı soğuk bir işlem olarak tanımlanmakta ve çürüme veya bozulmadan kaynaklanan zararların azaltılmasında da rol oynamaktadır (Ehlermann, 2016). Işınlamaya karşı hiçbir mikroorganizmanın direnç geliştirememesi, ışınlama teknolojisinin ambalajlanmış son ürüne uygulanabilir olması, toksik kalıntı bırakmaması ve nispeten düşük maliyetli olması bu uygulamanın avantajları arasında yer almaktadır (Singh vd., 2015).

Işınlamanın etkisi; doğrudan (fiziksel) etki ve dolaylı (kimyasal) etki olarak iki temel mekanizma

ile açıklanmaktadır. Fiziksel etkide, ışınlar doğrudan hücre bileşenleri ile reaksiyona girmektedir. Hücrenin canlılığını devam ettirebilmesi için gerekli olan bazı bileşenlere çok hızlı hareket yükleyerek, çarpma sonucu hücreye hasar vermekte, DNA gibi moleküllere enerjisini aktararak iyonize olmalarına neden olmakta ve bu şekilde hücre çoğalmasını önlemektedir. Kimyasal etkide ise, ışınlama su moleküllerini H⁺ ve OH⁻ radikallerine ayrıştırmakta ve oluşan radikaller hücrede yükseltgenme ve indirgenme etkisi yapmaktadır (Lung vd., 2015).

Gıda ışınlama için kullanılan iyonize ışın; radyoaktif kaynaklardan ve elektrik ile çalışan makinelerden olmak üzere iki şekilde sağlanmaktadır. Radyoaktif kaynaklara gama ışınları (γ) (Kobalt-60 (⁶⁰Co) ve Sezyum-137 (¹³⁷Cs) gibi radyoaktif izotoplardan); elektrikle çalışan makinelere ise X ışınları (X ışını tüplerinden veya doğrusal hızlandırıcılardan) ve elektron demeti (lineer veya diğer hızlandırıcılardan) örnek verilebilmektedir (Pillai ve Shayanfar, 2017).

Güvenlik önlemi olarak Codex Alimentarius Komisyonu (Codex), gıdalarda ışınlama dozunun 10 kGy'yi geçmemesi gerektiğini vurgulamaktadır. Fregonesi vd. (2014) 1.5 ve 3 kGy dozunda ışınlamaya maruz bırakılan kuzu etleri arasında; 3 kGy'lik doz uygulanan etlerin fizikokimyasal özelliklerinde olumsuz değişim olmadan mikroorganizmaların azaldığını ve +1 °C'de muhafaza edilmesinin saklanan kuzu etlerinin raf ömrünü 14-56 gün uzattığını vurgulamışlardır. Kundu vd. (2014) 1 kGy dozunda ışınlamaya maruz bırakılan sığır etlerine inoküle edilmiş *Salmonella* sayılarında 1.9 log KOB/g, *E. coli* O157:H7 sayılarında ise 3.9 log KOB/g azalma olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar 1 kGy dozundaki ışınlamanın, sığır etlerinde *E. coli* O157:H7 tehlikesini ortadan kaldırdığını vurgulamışlardır. Ayrıca, de la Paz Xavier vd. (2014) köftelere 2.5 kGy dozuna kadar uygulanan ışınlamanın *L. monocytogenes* üzerinde 2 log KOB/g; *E. coli* O157:H7 üzerinde ise 5 log KOB/g azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırma ile dondurulmuş sığır etlerinin güvenliğini sağlamak için ışınlama uygulamasının

başarılı bir şekilde kullanılabileceği kanıtlanmıştır. El-Ghafour vd. (2017) balık filetolarına uygulanmış 1.2 ve 3 kGy dozlarındaki γ ışınlarının, mikrobiyal yükleri azaltmak için yeterli olduğunu ve ışınlamanın balık filetolarının raf ömrünü uzattığını, ancak tüm kalite parametreleri dikkate alındığında 3 kGy'lik dozun daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Et ürünlerinde kullanılan ışınlama kaynaklarının etkinliği; ürün çeşitlerine ve uygulanan doz miktarlarına göre değişebilmektedir. Silva vd. (2015) sığır etlerine uygulanmış 2, 4 ve 6 kGy arasındaki γ ışını dozlarının öncesi ve sonrasında, *Staphylococcus* türlerini izole etmeyi ve tanımlamayı amaçlamışlardır. Sonuç olarak araştırmacılar, ışınlamanın mikrobiyal yükü önemli ölçüde elimine ettiğini ve uygulanan dozun artması ile canlı kalan türlerin sayısını azalttığını bildirmişlerdir. Ham vd. (2017) pişirildikten sonra sığır kıymalarına uygulanan elektron demeti ve domuz sosilerine uygulanan γ ışınlarının, ürünlerdeki toplam canlı sayısını tespit edilebilir limitlerin altına düşürdüğünü bildirmişlerdir. Haquea vd. (2017) taze etlere uygulanan γ ışınlarının besin kalitesine zarar vermeden mikrobiyal popülasyonu önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar genel kabul edilebilirlik ve raf ömrü açısından, 2 ve 4 kGy'lik dozlarda uygulanan ışınlamaya kıyasla 6 kGy'lik dozun daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. Deepika vd. (2017) elektron demeti uygulanmış domuz sosislerinde toplam canlı sayısı, *S. aureus* ve maya-küf sayılarının; artan ışınlama dozu ile önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma ile tüm uygulanan elektron demeti dozları arasından 4.5 kGy'lik ışınlama dozunun, uygulanan 3 ve 3.5 kGy dozlarına kıyasla mikrobiyal yükü azaltmada daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Engel teknolojisinde kullanılan diğer yöntemler ile birlikte II uygulanması, et ve et ürünlerinde patojen ve bozulma etmeni olan mikroorganizmaların dekontaminasyonunda daha etkili olmaktadır. Li vd. (2015) sığır etlerine inoküle edilen *Salmonella* ve *E.coli*'ye karşı kullanılan laktik asit ile birlikte düşük dozdaki (1 ve 3 kGy) elektron demeti uygulamasının antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığını

belirtmişlerdir. Araştırmacılar, 1 kGy dozundaki elektron demeti ve %5'lik laktik asit çözeltisinin birlikte uygulanmasının *Salmonella* sayısında 1.8 log KOB/g azalmaya neden olduğunu, *E. coli* gelişimini ise sınırladığını vurgulamışlardır. Huq vd. (2015) mikroenkapsüle edilmiş uçucu yağların ve nisin ile birlikte γ ışını uygulanmasının, tüketime hazır et ürünlerinde sinerjistik antimikrobiyal etkiye sebep olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, mikroenkapsüle edilmiş kekik ve tarçın ile birlikte 1.5 kGy dozda γ ışını uygulanmasının, *L. monocytogenes* sayısında 3.5 log KOB/g azalmaya neden olduğunu ifade etmişlerdir. Koluman ve Dikici (2016) bazı balık türlerinde, nisin kullanmadan yalnızca 5 kGy γ ışını uygulaması ile *L. monocytogenes*'in inhibe edilebileceğini; ancak nisin kullanımının *L. monocytogenes*'in inhibe edilmesi için gerekli dozun azaltılarak 3 kGy'lik dozun yeterli olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar nisin ile γ ışınlarının birlikte kullanılmasının farklı balık ürünlerinde de *L. monocytogenes* üzerinde etkili olduğunu vurgulamışlardır. Hassanzadeha vd. (2017) üzüm çekirdeği ekstraktı içeren kitosan bazlı yenilebilir bir film ile kaplanmış piliç etlerinde 2.5 kGy dozda γ ışını uygulamasının, bakteriyel gelişimi sınırladığını ve +4 °C'de depolanan piliç etlerinin 7 günlük raf ömrünü 14 güne uzattığını bildirmişlerdir.

Ultraviyole ışınları (UV)

Elektromanyetik spektrumun 100-400 nm aralığında bulunan küçük bir bölümünü oluşturan UV, insan vücudunu bronzlaştıran UV-A (320-400 nm), cilt yanığı ve cilt kanserine neden olan UV-B (280-320 nm), mikroorganizmaları öldürücü (germisidal) etki yapan UV-C (200-280 nm) ve vakum altında yayılabilen vakum UV (100-200 nm) olarak alt sınıflara ayrılmaktadır (Nagarajarao vd., 2016).

UV-C; bakteri, virüs, protozoa, maya, küf ve alg gibi mikroorganizmalara karşı öldürücü bir etkiye sahiptir. Park vd. (2015) piliç göğüs etlerine uygulanmış 3600 mWs/cm² UV-C (260 nm) ışığın, 4.84 log KOB/g inoküle edilen hepatit A virüsünde (HAV) ve 4.34 log KOB/g inoküle edilen murine norovirüste (MNV-1) sırasıyla 1.17 log KOB/g ve 1.23 log KOB/g azalmaya neden

olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, fizikokimyasal ve duyuşal özellikler dikkate alındığında; 600-1200 mWs/cm² UV-C ışığın, HAV ve MNV-1 virüslerine karşı etkili olduğunu vurgulamışlardır.

Mikrobiyal inaktivasyonun gerçekleşebilmesi için, gıdanın en az 0.04 J/cm² enerjiye maruz kalması gerekmektedir. UV-C ışık, aynı DNA dizisindeki timin ve sitozinler arasında çapraz bağlanmaya yol açarak mutasyona sebep olmakta ve bu yolla mikrobiyal hücrelerin ölmesini sağlamaktadır. UV-C ışınlama teknolojisi; su veya kimyasal kullanılmasını gerektirmediği, çevre dostu ve sürdürülebilir bir teknoloji olduğu için son yıllarda sağlık ve gıda sektörü tarafından yüzey dekontaminasyonunda kullanılmaktadır (Sommers ve Sheen, 2015).

UV-C ışınlama uygulaması; sıvıda sterilizasyon, havanın dezenfeksiyonu ve yüzeyde mikroorganizmaların inhibisyonu olmak üzere 3 şekilde mikroorganizmalar üzerinde öldürücü etkiyi sağlamaktadır (Rodionova ve Paliy, 2016). Mikroorganizmaların UV-C ışınlarından etkilenmelerinde; tür, suş, kültür ve büyüme gibi mikroorganizmalara ait çeşitli faktörler ve gıdanın çeşidi ile yapısı önemli rol oynamaktadır. Lazaro vd. (2014) *Salmonella* inoküle edilen piliç göğüslerine, 90 saniye boyunca uygulanan 0.62, 1.13 ve 1.95 mW/cm² dozlarında UV-C uygulamalarından, yüksek yoğunluklu olan 1.95 mW/cm² dozun başlangıç bakteri yükünde 7.28 log KOB/g azalma sağladığını ve ayrıca mikrobiyal gelişimde lag fazını ve ürünün raf ömrünü uzattığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, UV-C ışığın piliç etlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkilemeksizin, mikrobiyal kalitesini arttıran alternatif bir teknoloji olduğunu vurgulamışlardır. Tarek vd. (2015) Bologna tipi paketlenmiş tüketime hazır et ürünlerinde; UV-C uygulamasının plastik filmlerin yüzey özelliklerini etkilemeksizin, *E. coli* popülasyonunda yaklaşık 1.5 log azalma sağlayabileceğini belirtmişlerdir. Sommers ve Sheen (2015) *Yersinia pestis* suşlarını inhibe etmek için uygulanmış 0.5 J/cm² UV-C ışık uygulamasının, *in vitro* ortamda 7 log KOB/g ve üzeri azalmaya neden olduğunu; sığır, piliç ve balık etlerinde ise 4 log KOB/g azalmaya yol

açlığını tespit etmişlerdir. Bu bakteride yaklaşık 1 log KOB/g azalma sağlayabilmek için 1 J/cm² UV-C ışık kullanılmasının yeterli olabileceğini belirten araştırmacılar, UV-C ışık kullanımının *Y. pestis*'e karşı etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Lee vd. (2015) kurutma işlemi uygulanmış dikenli çütre (*Thamnaconus modestus*) ve dilimlenmiş kalamar (*Todarodes pacificus*) yüzeylerine farklı dozlarda (0-18 kJ/m²) UV-C ışık (253.7 nm) uygulamanın; *E. coli*, *S. aureus* ve *B. cereus* bakterilerinin gelişimini önemli ölçüde engellediğini bildirmişlerdir. 18 kJ/m² UV-C dozunda ışınlanmanın; dikenli çütre yüzeyine inoküle edilmiş *E. coli*'yi 2.70 log KOB/g, *S. aureus*'u 2.55 log KOB/g ve *B. cereus*'u 2.57 log KOB/g; dilimlenmiş kalamar yüzeylerine inoküle edilmiş *E. coli*'yi ise 1.35 log KOB/g, *S. aureus*'u 0.54 log KOB/g ve *B. cereus*'u 1.05 log KOB/g azalttığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar, bu ürünlerde *E. coli* ve *B. cereus*'un tamamen inaktive edilmesi için 6-9 kJ/m² UV-C ışınlanmanın kullanılmasını önermiştir. Bununla birlikte, dilimlenmiş kalamar yüzeyindeki *S. aureus*'un dekontaminasyonu için, UV-C ışınlanmanın kimyasal dezenfektanlarla birlikte kullanılmasının daha etkili olacağını vurgulamışlardır.

UV-C ışık, genellikle ortam havasında taşınan bakteri yükünün kontrolü amacıyla et ve et ürünleri üretim hatlarında ve et karkaslarının muhafazasında soğuk depolarda kullanılmaktadır (Lazaro vd., 2014). Rodionova ve Paliy (2016) üretim tesislerinde kullanılan kapalı tip UV-C ışınlama cihazlarının, tesislerdeki toplam mikroorganizma sayısını %2.5 oranında azalttığını ve UV-C ışınlanmanın et üretim tesislerindeki havanın dezenfeksiyonu için oldukça etkili bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır.

UV-C ışığın penetrasyon gücünün zayıf olması sebebiyle, uygulanan gıdaların sadece yüzeylerine etki etmesi kullanımını sınırlamaktadır (Lazaro vd., 2014). Bu nedenle UV-C ışık ile birlikte engel teknolojisinde kullanılan diğer yöntemlerin aynı anda uygulanması, sinerjik bir etki yaratarak; ışınlanmanın etkinliğini arttırmaktadır. Ha ve Kang (2015) dilimlenmiş jambonlara 70 saniye uygulanmış yakın kızıl ötesi ve UV-C ışık kombinasyonunun; *E. coli*'de 3.62 log KOB/g, *S.*

Typhimurium'da 4.17 log KOB/g ve *L. monocytogenes*'de 3.43 log KOB/g azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bottino vd. (2017) vakum paketlenen balık filetolarına uygulanmış düşük (55.83 mJ/cm²) ve yüksek (160.97 mJ/cm²) dozlardaki UV-C ışığın, yalnızca vakum paketlenme yapılmış filetolara kıyasla hem oluşan koloni sayılarını hem de bu kolonilerin büyüme oranlarını azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, UV-C ışığın filetolardaki mikrobiyal büyüme parametrelerini yavaşlatarak ve kimyasal değişiklikleri geciktirerek, filetoların raf ömrünü en az %50 arttırdığını vurgulamışlardır. Yang vd. (2017) piliç göğüs etine uygulanmış UV-C ışık ile birlikte ticari bakteriyofajın, *L. monocytogenes* üzerinde 2.04 log KOB/g azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, yalnızca ticari bakteriyofaj uygulanmış piliç etlerinde; 0.84 log KOB/g azalma olduğunu ifade ederek, UV-C ışığın kullanımı ile *L. monocytogenes* inhibisyonunun etkinliğinin arttığını vurgulamışlardır. Yeh vd. (2018) sığır kıymalarına 3.5 log KOB/g inoküle edilen *Salmonella* suşlarının, bakteriyofaj ilavesi ve UV ışık kullanımı ile 2 log KOB/g'a düştüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar, bakteriyofaj ve UV ışığın birlikte kullanımının; et sanayinde *Salmonella* kontrolü için uygun olabileceğini vurgulamışlardır.

Vurgulu elektrik alan (VEA)

“Atımlı/darbeli elektrik alan” veya “yüksek voltaj elektrik alan” uygulamaları olarak da bilinen VEA uygulamaları genellikle 1-100 mikrosaniye (μ s) gibi kısa süre ve yüksek elektriksel alan esasına dayanan, ısı işlemin yerini alabilecek yöntemlerden biri olarak tanımlanmaktadır (Horita vd., 2018). VEA yöntemi, gıdaların duysal özelliklerinde ve besin değerlerinde herhangi bir olumsuz değişime neden olmadan mikroorganizmaların vejetatif formlarının inaktivasyonunu gerçekleştirebilmektedir (Stoica vd., 2013). Özel odalarda gerçekleştirilen VEA uygulamalarında, iki elektrot arasına gıda maddesi yerleştirilmekte ve 0.5–80 kV/cm yüksek voltaj elektrik alanına maruz bırakılmaktadır (Horita vd., 2018). VEA uygulaması, mikroorganizmaların hücre duvarında elektroporasyona ve elektriksel yıkıma neden olarak; hücre organellerini

çatlatmakta, hücre içeriğini azaltmakta ve hücrenin temel fonksiyonlarını yavaşlatarak, inaktivasyonunu gerçekleştirmektedir (Li ve Farid, 2016).

VEA'nın mikroorganizma inaktivasyonunda başarılı olmasında; uygulanan yöntem, seçilen gıdanın çeşidi ve mikrobiyal faktörler oldukça önemlidir. VEA'a bağlı faktörler arasında elektrik alan yoğunluğu, vurgu/darbe genişliği, uygulama süresi ve sıcaklık artışı yer alırken; gıdaya bağlı faktörler arasında gıdanın iletkenliği, sıcaklığı ve pH'sı, mikrobiyal faktörler arasında ise; mikroorganizma türü, konsantrasyonu ve mikroorganizmanın gelişme aşamasında olup olmaması yer almaktadır (Panwar vd., 2015). Stachelska vd. (2012) 28 MHz darbe frekansı ve 300 V/m VEA uygulamasının, sığır kıymalarına 6.7 log KOB/g düzeyinde inoküle edilmiş *Y. enterocolitica*'nın inaktive edilebilmesi için yetersiz olduğunu; ancak darbe frekansının 280 MHz'e çıkarılması ile *Y. enterocolitica* inaktivasyonunun sağlandığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, 2800 MHz ile birlikte uygulanan VEA'in hem +4 °C'de hem de -20 °C'de depolanan etlerdeki mikroorganizma kontrolünde oldukça etkili olduğunu vurgulamışlardır.

VEA, gıdalarda meydana gelen bozulmaların etkisini azaltmak için verimli bir yöntem olmasının yanı sıra; *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* ve *S. Typhimurium* gibi halk sağlığı açısından risk oluşturabilen patojenik vejetatif mikroorganizmaların etkinliğini de sınırlamaktadır (Stratakos ve Koidis, 2015). VEA uygulamasının, bakteri sporları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı ve bu uygulamaya karşı; bakterilerin mayalara göre daha dirençli, Gram negatif bakterilerin ise Gram pozitif bakterilere göre daha fazla duyarlı olduğu belirtilmektedir (Li ve Farid, 2016).

VEA'da geleneksel ısıl yöntemlerden farklı olarak, oda sıcaklığında ve μ s ya da milisaniye düzeyindeki kısa sürelerde işlem tamamlanabilmektedir. Bu teknolojiye kimyasal koruyucu kullanılmamaktadır (Güven ve Yıldız, 2016). Uygulamanın düşük enerji tüketimi ve sürekli çalışabilirliği gibi avantajları bulunmaktadır (Nagarajaro vd., 2016). VEA uygulaması et

endüstrisinde daha çok karkasların elektrostimülasyonunda, etlerin tenderizasyonunda ve tüketime hazır et ürünlerinin yüzey dekontaminasyonunda kullanılmaktadır (Horita vd., 2018). Saif vd. (2006) 32 dakikalık VEA uygulaması sonrasında, keçi eti yüzeyine inoküle edilmiş *E. coli* O157:H7'nin 8 log KOB/g azaldığını bildirmişlerdir. Özer ve Demirci (2006) *E. coli* O157:H7 inoküle edilmiş ve VEA uygulanmış somon filetoların kaslarında; maksimum 1.09 log KOB/g, yüzeylerinde ise maksimum 0.8 log KOB/g azalma gözlemlenmiştir. *L. monocytogenes* için ise kaslarda maksimum 0.74 log KOB/g, yüzeylerde ise maksimum 1.02 log KOB/g azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan literatür taraması sonucunda; et ve et ürünlerinin güvenilirliği ve kalitesi açısından daha iyi sonuçların elde edilebilmesi için, VEA ile antimikrobiyal ajanların ve diğer engel parametrelerinin birlikte kullanılması gerektiği önerilmektedir.

Atımlı ışık (AI)

Radyasyon kullanılarak yapılan, ürünün içeriğine ve yüzeyine zarar vermeden antimikrobiyal bir etki sağlayan AI uygulaması, mikroorganizmaların inaktive edilmesinde Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration-FDA)'nin kullanımına izin verdiği etkili bir sterilizasyon yöntemidir (Zhou, 2010; Rajkovic vd., 2010). AI yönteminde; 200-1000 nm aralığındaki UV bölgedeki geniş spektrumlu dalga boyları kullanılmaktadır (Bhavva ve Hebbar, 2017).

Son yıllarda elde edilen bilgiler, AI teknolojisinin yüzeylerden ve sıvılardan hem vejetatif hücrelerin hem de sporların dekontaminasyonu için yüksek potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Nicorescu vd., 2014; Heinrich vd., 2016).

AI yönteminin mikroorganizmaları inaktive etme mekanizması, UV ışık uygulaması ile benzer olup; esas olarak DNA'nın transkripsiyonunu ve translasyonunu engelleyen foto-ürünlerin oluşumu ile açıklanabilmektedir (Pan vd., 2017). AI uygulaması, DNA hasarına ek olarak; hücrenin ve hücre çevresindeki ortamın farklı adsorpsiyonu sonucu ısıl bir stres oluşturarak hücre yapısına da

zarar vermektedir (Li ve Farid, 2016; Kramer vd., 2017). Keklik vd. (2010) 2.4 J/cm² ve 24.2 J/cm² enerji yoğunluğu uygulamasına maruz kalan piliç örneklerinde *S. Typhimurium*'un 2 log KOB/g azaldığını ifade etmişlerdir. Nicorescu vd. (2014) çiğ ve pişmiş domuz rostoları ve çiğ somon örneklerine uygulanmış AI yönteminin, *Pseudomonas fluorescens* inaktivasyonunda yalnızca 1 log KOB/g azalmaya neden olduğunu; doğal olarak oluşan aerobik floranın inhibe edilmesinde ise yeterli düzeyde etkili bulunduğunu tespit etmişlerdir. 10 ve 30 J/cm² enerji yoğunluğu uygulanmış, çiğ ve pişmiş domuz rostolarındaki aerobik flora üzerinde; 1 ve 3.4 log KOB/g arasında azalmaya neden olduğunu ve bu sayede domuz eti örneklerinde mikrobiyal güvenliğin sağlandığını ve raf ömürlerinin uzatıldığını vurgulamışlardır. Bununla birlikte, 30 J/cm² enerji yoğunluğu uygulamasının, çiğ somon örneklerinde 0.8 log KOB/g gibi sınırlı miktarda aerobik flora azalmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, AI teknolojisinin hem aerobik flora, hem de *P. fluorescens* inaktivasyonu için bir potansiyele sahip olduğunu; ancak tatmin edici seviyede dekontaminasyon ve yüksek ürün kalitesi elde etmek için orta derecede akıcılığa sahip AI uygulanması gerektiğini ifade etmişlerdir.

AI yöntemi, gıdalarda bozucu mikroorganizmalar üzerinde çok geniş bir antimikrobiyal etki göstermesine rağmen bazı mikroorganizmaların bu yönteme karşı sergiledikleri hassasiyet değişmektedir. Örneğin AI uygulamasına karşı bakteri direncinin, küf sporlarına göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Heinrich vd., 2015). Özer ve Demirci (2006) 5.6 J/cm² enerji yoğunluğu uygulanan somon filetolarında, *E. coli* O157:H7 ve *L. monocytogenes*'in 1 log KOB/g azaldığını bildirmişlerdir. Ganan vd. (2013) AI yöntemi uygulanmış fileto ve sosis gibi kürlenmiş et ürünleri yüzeyindeki *L. monocytogenes* ve *Salmonella*'da maksimum 1.5–1.8 log KOB/g azalma olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, AI uygulamasının kuru işlenmiş et ürünlerinin güvenilirliğini arttırmak için kullanılabilir, ısı olmayan bir teknik olduğunu vurgulamışlardır.

AI yönteminin daha çok gıda yüzeylerindeki mikrobiyal popülasyonu azaltmak veya kullanılan

ekipmanları ve ambalaj materyallerini sterilize etmek için kullanıldığı da görülmektedir (Nagarajao vd., 2016). Rajkovic vd. (2012) bıçakların et ile temas eden yüzeylerindeki *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 dekontaminasyonu için AI yönteminin, başarılı bir şekilde uygulanabileceğini bildirmiştir. Rajkovic vd. (2017) 3 J/cm² enerji yoğunluğu uygulanmış, dilimlenmiş fermente salam yüzeyindeki *L. monocytogenes*'i 2.24 log KOB/g, *E. coli* O157:H7'i 2.29 log KOB/g, *S. Typhimurium*'u 2.25 log KOB/g ve *S. aureus*'u 2.12 log KOB/g azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar yapmış oldukları bu çalışma ile AI'nın lipid ve protein oksidasyonu ile kalite özelliklerini etkilemeden fermente salamaların mikrobiyal güvenliğini iyileştirebileceğini vurgulamışlardır. McLeod vd. (2017) 1.25-18.0 J/cm² arasındaki akışlarda uygulanmış AI'nın piliç fileto yüzeylerine inoküle edilmiş *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermospacta* ve *Carnobacterium divergens* üzerinde 0.9-3.0 log KOB/g arasında azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar AI yönteminin, piliç fileto yüzeylerinde patojen ve bozulma etmeni olan mikroorganizmaların canlılığını azaltmak için faydalı bir teknik olduğunu vurgulamışlardır.

Ayrıca, AI uygulamasının etkinliğini arttırmak için diğer engel parametreleri ile birlikte kullanıldığı da görülmektedir. Hierro vd. (2011) vakum paketlenmiş jambon dilimlerinin yüzeylerine uygulanan AI'nın *L. monocytogenes* yükünü 1.78 log KOB/g azalttığını bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar, hem AI uygulamasına, hem de vakum paketlemeye tabi tutulan örneklerin sadece vakum paketlenmiş örneklere göre raf ömürlerinin 30 gün arttığını vurgulamışlardır.

Yüksek basınç (YB)

Isıl yöntemlere alternatif olarak geliştirilen ve gıdalarda soğuk pastörizasyon yöntemi olarak son yıllarda ilgi uyandıran YB veya yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulamaları; gıdalardaki patojen veya bozulma etmeni olan mikroorganizmaları azaltmayı hedefleyen bir dekontaminasyon yöntemidir (Valdramidis vd., 2015; Hughes, 2016).

YB uygulamasının; mikroorganizmalar ve protein/enzimler üzerine etkisi yüksek sıcaklıktan kaynaklanan etkilere benzemektedir. “Hafif teknoloji” olarak kabul edilen YB’nin, et ürünlerinde bulunan mikroorganizmaları inhibe edici özelliği bulunmasına rağmen; ürünlerde tekstür, renk ve oksidatif bozulmalara yol açtığı görülmektedir (Del Olmo vd., 2014; Medina-Meza vd., 2014; Barba vd., 2015).

Çeşitli gıdaların işlenmesi ve korunmasında kullanılan bu yöntemde; genellikle 100-600 MPa aralığında basınç uygulanmakta ve yöntem; materyali çevreleyen suyun sıkıştırılması prensibine dayanmaktadır (Rajkovic vd., 2010).

YB uygulamaları; çok çeşitli gıda ürünlerinin pastörize edilmesi ve raf ömrünün uzatılması için endüstriyel olarak uygulanan çevre dostu bir yöntemdir. Genel olarak, gıdalarda bulunan düşük su aktivitesinin mikroorganizma hücrelerini basınca karşı koruduğu belirtilmektedir (Cheftel ve Culioli, 1997) ve bu nedenle YB uygulamasının su aktivitesi yüksek gıdalarda daha etkin bir şekilde kullanıldığı görülmektedir. Japonya, Amerika ve bazı Avrupa ülkelerinde başta et ürünleri ve deniz mahsülleri olmak üzere meyve suyu, reçel ve süt gibi birçok gıdada kullanılan YB; basınç, sıcaklık ve işlem süresi gibi proses parametrelerine ve pH, iyonik şiddet, su aktivitesi, tuz içeriği ve diğer antimikrobiyallerin varlığı gibi gıdaların karakteristik özelliklerine bağlıdır (Rajkovic vd., 2010). Sommers vd. (2016) piliç etinden hazırlanmış kıymalara inoküle edilmiş *E. coli*’yi 1 log KOB/g azaltmak için 30.6 dakika boyunca 300 MPa, 8.37 dakika boyunca 400 MPa ve 4.43 dakika boyunca 500 MPa basınç uygulanması gerektiğini belirtmişlerdir. Sommers vd. (2017) tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise; *Staphylococcus saprophyticus* inoküle edilmiş piliç etinden hazırlanmış kıymalara 15.5 dakika boyunca 200 MPa, 9.43 dakika boyunca 300 MPa ve 3.54 dakika boyunca 400 MPa basınç uygulamasının; kıymalarda 1 log KOB/g azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda, artan basınç uygulamalarına bağlı olarak test mikroorganizmalarının 1 log azaltılması için

gerekli olan uygulama sürelerinin düştüğü görülmektedir.

YB uygulamaları; gıdalardaki patojen ve bozulma etmeni olan mikroorganizmaların azaltılması ve geleneksel ısıl işlemler esnasında zarar gören organoleptik özelliklerin korunması gibi birtakım avantajlara sahiptir (Medina-Meza vd., 2014). Botsaris vd. (2015) vakum paketlenerek 3 dakika boyunca 600 MPa basınç uygulanmış jambon örneklerine ait toplam aerobik koloni sayılarının, +4 °C’de 28 günlük depolama süresince 2 log KOB/g ve altında kaldığını; basınç uygulanmamış örneklerle ait koloni sayılarının ise 10 log KOB/g ve üzerine ulaştığını belirtmişlerdir. Ayrıca, YB uygulamasının ürünlerin organoleptik özelliklerini etkilemediği bildirilmiştir. YB uygulamaları gıda muhafazasına ek olarak; tekstür, su tutma kapasitesi ve kas proteinlerinin jelatinizasyonu gibi et yapısını iyileştirerek, yeni ürünlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Pingen vd., 2016).

Mikroorganizmaların morfolojisi, biyokimyasal reaksiyonları, genetik mekanizmaları, hücre zarları, duvarları ve spor kılıfları üzerinde değişimlere yol açan YB; aynı zamanda mikroorganizmaların hücre duvarının hücre zarından ayrılmasına, çekirdek veya hücre içi organellerin değişmesine ve hücre içi maddelerin hücre dışına sızması gibi morfolojik değişimlere neden olmaktadır (Barba vd., 2017).

Genellikle ısıya karşı dirençli olan mikroorganizmalar, basınca karşı da direnç göstermektedir. Mikroorganizma sporları YB uygulamasına karşı oldukça dirençli olmalarına rağmen, maya ve küflerin vejetatif formları 200-300 MPa aralığındaki basınç ile inaktive edilebilmektedir. Hajos vd. (2004) 600 MPa basınç uygulanmış sosis hamurlarının doğal mikroflorasında bulunan toplam canlı hücre sayısında 3 log KOB/g’den daha fazla azalma meydana geldiğini belirtmişlerdir. Garriga vd. (2004) sığır filetolarına uygulanan YB yönteminin aerobik, psikrotrofik ve laktik asit bakterisi (LAB) sayısında 4 log KOB/g bir azalmaya neden olduğunu vurgulamışlardır. Gram negatif bakteriler ise, Gram pozitif bakterilere göre ısıya

ve basınca karşı daha duyarlıdırlar (Hugas vd., 2002; Garriga vd., 2004; Li ve Farid, 2016). Ayrıca YB'nin *C. jejuni*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enteridis*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* ve *Y. enterocolitica* gibi önemli gıda patojenlerine karşı etkili olduğu ifade edilmiştir (Hajos vd., 2004). Kruk vd. (2011) piliç göğsü filetolarına uygulanmış 450 ve 600 MPa basınçların, üç önemli patojen olan *S. Typhimurium*, *E. coli* ve *L. monocytogenes* inaktive ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar; 600 MPa basınç uygulanmış piliç göğsü filetolarındaki bakteri yükünün 7-14 gün boyunca 6-8 log KOB/g, 450 MPa basınç uygulanmış örneklerin ise 3-14 gün boyunca 4-8 log KOB/g azaldığını bildirmişlerdir. Yapılmış bu çalışma ile YB uygulamasının mikrobiyal bozulmayı azaltarak, filetoların raf ömrünü uzatmada etkili bir teknik olduğu görülmektedir.

YB uygulamasının enzimatik karışımlar, doğal antimikrobiyal ve antioksidan maddeler gibi diğer engel parametreleri ile birlikte kullanılabilir olması bu yöntemin etkinliğini artırmaktadır (Akkara ve Kayaardı, 2014). Hugas vd. (2002) 600 MPa basınç uygulanmış vakum ambalajlı pişmiş jambonlarda, bozulma yapan mikroorganizmaların gelişiminde önemli bir gecikme gözlemlendiğini ve böylece uygulama sonrası örneklerin en az 60 gün boyunca duyuşal tazeliğini koruduğunu bildirmişlerdir. Lerasle vd. (2014) modifiye atmosfer altında paketlenmiş (MAP) ve 5 dakika boyunca 500 MPa basınç uygulanan piliç etinden hazırlanmış sosislerde, MAP uygulamasının tek başına mikrobiyal kaliteyi iyileştirmediğini; bu yöntemin YB uygulaması ile birlikte kullanılması ile etkinliğinin arttığını ve toplam mezofilik aerob ve LAB sayılarını azaltarak sosislerin raf ömürlerini uzattığını bildirmişlerdir. Banerjee vd. (2017) vakum paketlenmiş koyun eti köftelerine uygulanmış 200-400 MPa YB ve 1.2 ve 3 kGy dozundaki ışınlama uygulamalarının, köftelerdeki toplam canlı sayısını 2-3 log KOB/g azalttığını ve bu yöntemlerin birlikte kullanılması ile köftelerin raf ömürlerinin uzadığını bildirmişlerdir.

Ultrasonik ses (US) dalgaları

Isıl olmayan alternatif teknolojilerden bir diğeri de US dalgalarıdır. Bu ses dalgaları bir sıvı içerisinde

geçtikleri zaman baloncuk veya kavitasyon oluşturmaktadırlar. US dalgalarının uygulanması sırasında oluşan başlıca aktif etki, sıvı içerisinde meydana gelen hava kabarcıklarının oluşumu ile sonuçlanan mekanik etkidir (Horita vd., 2018).

İnsanın işitme sınırı 15-20 kHz olup; US dalgaları insan kulağının işitebileceğinin üzerindeki ses dalgalarıdır ve frekansı 50 kHz'in üzerindedir. US dalgalarının hızı; ortamın fizyolojik durumuna ve sıcaklığına bağlıdır. Genel olarak, US dalgası ekipmanlarında 20 kHz ile 10 MHz arasındaki frekanslar kullanılmaktadır. Yüksek güç için düşük frekanslar tercih edilmekte ve 20 kHz ile 100 kHz arasındaki frekanslarda gıdalardaki mikroorganizmaları inaktif hale getiren kavitasyonu yaratan güçlü US dalgası oluşmaktadır (Nagarajarao, 2016).

Isıl işlem uygulamalarına alternatif olarak geliştirilen ultrases; meydana getirdiği kavitasyon sayesinde mikroorganizmaların hücre duvarlarını parçalayarak, onları inaktive etmektedir. US işlemi sayesinde kavitasyon oluşmakta ve gaz kabarcıkları da bu ortamda meydana gelmektedir. US enerjisi gaz kabarcıklarındaki buharı etkin bir şekilde tutamadığı için gaz kabarcığı patlamakta ve ortamda yoğunlaşmaktadır. Yoğunlaşan ortam ani olarak yüksek bir basınç ve sıcaklık bölgesi oluşturmaktadır. Oluşan bu ortamda bulunan mikroorganizmaların hücre duvarları zarar görmekte ve bunun sonucunda mikroorganizmalar inaktif hale gelmektedir (Turantas vd., 2015). Bu ısıtılmış bölge çok sınırlı bir alanı kapsadığı için mikroorganizmaların tamamını öldürememektedir (Zinoviadou vd., 2015; Barba vd., 2017). Bu nedenle uygulanan US işleminin gıdaların her tarafına homojen bir şekilde ulaştırılması oldukça önemlidir.

US dalgalarının; *Salmonella* serotipleri, *E. coli*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus* gibi patojenleri ve bozulma etmeni olan mikroorganizmaları inaktive etmek için başarılı bir şekilde kullanıldığı görülmektedir (Nagarajarao vd., 2016). Yapılan bir çalışmada, model bir sisteme uygulanmış 60 W US dalgalarının; *L. monocytogenes* üzerinde 4 log KOB/g azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Wu ve Narsimhan, 2017). Pinon vd. (2012) piliç

etlerine 20 kHz frekansında 5 dakika uygulanmış US'in, psikrofilik bakterileri 0.2 log KOB/g azalttığını bildirmişlerdir.

US işleminin mikroorganizmaları inaktive ettiği ispatlanmasına rağmen, bu yöntemin tek başına uygulanması sonucunda, ürünlerdeki mikroorganizma sayısının azaltılmasında çok etkili olmadığı belirtilmektedir. Bu nedenle US'in başka yöntemler ile birlikte kombine edilerek uygulanmasının daha etkili olacağı vurgulanmaktadır. Ultrases ve ısıl işlem (termosonikasyon); US ve basınç (manosonikasyon); ultrases, basınç ve ısıl işlem (manotermosonikasyon) uygulamaları kombine yöntemlere örnek olarak gösterilebilmektedir (Panwar vd., 2015; Troy vd., 2016). Kordowska-Wiater ve Stasiak (2011) 2.5 W/cm² yoğunluğunda ve 40 kHz frekansında uygulanmış US'nin, piliç kanatlarının yüzeyindeki *Salmonella* serotipleri., *E. coli* ve *P. fluorescens*'ı 1 log KOB/g azalttığını; US ile birlikte %1 oranında laktik asit kullanımının ise patojenlerde 1.5 log KOB/g'dan daha fazla (4 log KOB/g'a kadar) azalmaya sebep olduğunu ifade etmişlerdir.

SONUÇ

Tüketiciler; besinsel ve duyuşal özelliklerinde minimum değişiklikler meydana gelmiş, yüksek kaliteli işlenmiş ürünler talep etmektedirler. Bu nedenle; et ve et ürünlerine uygulanan ısıl olmayan yöntemler arasında yer alan iyonize ışınlama teknolojisinin; ambalajlanmış son ürüne uygulanabilir olması, toksik kalıntı bırakmaması ve ışınlamaya karşı hiçbir mikroorganizmanın direnç geliştirememesi nedeniyle tüketicilerin beklentilerini karşılayacağı düşünülmektedir. Ayrıca, iyonize ışınlama teknolojisinin antimikrobiyal maddeler (laktik asit, nisin, uçucu yağlar vb.) ile birlikte uygulanmasının; mikrobiyal güvenlik açısından daha etkili olabileceği de öngörülmektedir. Ancak ısıl olmayan teknolojiler ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olup, bu dekontaminasyon tekniklerinde maliyetleri en aza indirmek ve uygulama sürecini kolaylaştırmak ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Yapılacak bu araştırmalar sayesinde, sanayi ile iş birliği kurulmasının ve bu teknolojilerin kısa sürede uygulamaya aktararak,

endüstriye entegrasyonunun sağlanmasının önemli olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akkara, M., Kayaardı, S. (2014). İleri muhafaza tekniklerinin et kalitesi üzerine etkisi. *Akademik Gıda*, 12(4), 79-85.
- Barba, F.J., Terefe, N.S., Buckow, R., Knorr, D., Orlien, V. (2015). New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. *Food Res Int*, 77, 725-742.
- Barba, F.J., Koubaa, M., Prado-Silvac, L., Orlien, V., Sant'Ana, A.S. (2017). Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends Food Sci Technol*, 66, 20-35.
- Banerjee, R., Jayathilakan, K., Chauhan, O.P., Naveena, B.M., Devatkal, S., Kulkarni, V.V. (2017). Vacuum packaged mutton patties: Comparative effects of high pressure processing and irradiation. *J Food Process Preserv*, 41, e12880.
- Botsaris, G., Taki, A. (2015). Effect of high-pressure processing on the microbial quality throughout the shelf life of vacuum-packed sliced ham and frankfurters. *J Food Process Preserv*, 39, 840-845.
- Bottino, F.O., Rodrigues, B.L., Ribeiro, J.D.N., Lazaro, C.A.T., Conte-Junior, C.A. (2017). Influence of UV-C radiation on shelf life of vacuum package tambacu (*Colossoma macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*) filets. *J Food Process Preserv*, 41, e13003.
- Cheftel, J. C., Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Sci*, 46(3), 211 - 236.
- De la Paz Xavier, M., Dauber, C., Mussio, P., Delgado, E., Maquieira, A., Soria, A. López, T. (2014). Use of mild irradiation doses to control pathogenic bacteria on meat trimmings for production of patties aiming at provoking minimal changes in quality attributes. *Meat Sci*, 98(3), 383-391.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nunez, M. (2014). Effect of high-pressure-processing and modified-

- atmosphere-packaging on the volatile compounds and odour characteristics of sliced ready-to-eat "lacon", a cured-cooked pork meat product. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 26, 134–142.
- Doğu, S. Ö., Sarıçoban, C. (2014). Et ve ürünlerinde dekontaminasyon yöntemleri. *Eur J Lipid Sci Technol*, 1(3), 92-99.
- Dupuy, C., Morlot, C., Gilot-Fromont, E., Mas, M., Grandmontagne, C., Gilli-Dunoyer, P., Gaya, E., Callait-Cardinal, M.P. (2014). Prevalence of *Taenia saginata* cysticercosis in French cattle in 2010. *Vet Parasitol (Amst)*, 203, 65–72.
- Deepika, P., Zende, R.J., Kshirsagar, D.P., Lande, V.S., Vaidya, V.M., Waghmare, R.N., Todankar, R.P., Shirke, A.H. (2017). Effects of electron beam irradiation on microbial quality of pork sausage stored at refrigeration temperature. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6(11), 3978-3987.
- Ehlermann, D.A.E. (2016). Particular applications of food irradiation: Meat, fish and others. *Radiat Phys Chem*, 129, 53-57.
- El-Ghafour, S.A., Zakar, A.H. (2017). Impact of gamma irradiation on the quality of tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) fillets stored under refrigerated condition. *Int J Chemtech Res*, 10(2), 573-581.
- Fregonesi, R.P., Portes, R.G., Aguiar, A.M.M., Figueira, L.C., Gonçalves, C.B., Arthur, V., Trindade, M.A. (2014). Irradiated vacuum-packed lamb meat stored under refrigeration: Microbiology, physicochemical stability and sensory acceptance. *Meat Sci*, 97(2), 151-155.
- Ganan, M., Hierro, E., Hospital, X.F., Barrosa, E., Fernandez, M., (2013). Use of pulsed light to increase the safety of ready-to-eat cured meat products. *Food Control*, 32, 512-517.
- Garriga, M., Grèbol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M., Hugas, M. (2004). Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 5, 451–457.
- Güven, E., Yıldız, H. (2016). Isıl olmayan yeni gıda muhafaza tekniklerinin sanayi uygulamaları-2. *Gıda*, 41,4.
- Ha, J-W., Kang, D-H. (2015). Enhanced inactivation of food-borne pathogens in ready-to-eat sliced ham by near-infrared heating combined with UV-C irradiation and mechanism of the synergistic bactericidal action. *Appl Environ Microbiol*, 81(1), 2-8.
- Ham, Y-K., Kim, H-W., Hwang, K-E., Song, D-H., Kim, Y-J., Choi, Y-S., Song, B-S., Park, J-H., Kim, C-J. (2017). Effects of irradiation source and dose level on quality characteristics of processed meat products. *Radiat Phys Chem*, 130, 259-264.
- Hassanzadeha, P., Tajikb, H., Rohanib, S.M.R., Moradib, M., Hashemic, M., Aliakbarlub, J. (2017). Effect of functional chitosan coating and gamma irradiation on the shelf-life of chicken meat during refrigerated storage. *Radiat Phys Chem*, 141, 103-109.
- Hajos, G., Polgar, M., Farkas, J. (2004). High-pressure effects on IgE immunoreactivity of proteins in a sausage batter. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 5, 443–449.
- Haqea, M.A., Hashema, M.A., Mujaffar, M.M., Rimaa, F.J., Hossainb, A. (2017). Effect of gamma irradiation on shelf life and quality of beef. *J Meat Sci Technol*, 5(2), 20-28.
- Heinrich, V., Zunabovic, M., Bergmair, J., Kneifel, W., Jager, H. (2015). Post-packaging application of pulsed light for microbial decontamination of solid foods: A review. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 30, 145-156.
- Heinrich, V., Zunabovic, M., Varzakas, T., Bergmair, J., Kneifel, W., 2016. Pulsed light treatment of different food types with a special focus on meat: A critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56(4), 591-613.
- Hierro, E., Barroso, E., de la Hoz, L., Ordonez, J. A., Manzano, S., Fernandez, M. (2011). Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 12, 275-281.
- Horita, C.N., Baptista, R.C., Caturla, M.Y.R., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Sant'Ana, A.S. (2018). Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination

- technologies to increase the microbiological quality and safety of cooked ready-to-eat meat products. *Trends Food Sci Technol*, 72, 45-61.
- Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J.M., (2002). New mild technologies in meat processing: High pressure as a model technology. *Meat Sci*, 62, 359–371.
- Hughes, B.H., Perkins, L.B., Yang, T.C., Skonberg, D.I. (2016). Impact of post-rigor high pressure processing on the physicochemical and microbial shelf-life of cultured red abalone (*Haliotis rufescens*). *Food Chem*, 194, 487–494.
- Huq, T., Vu, K.D., Riedl, B., Bouchard, J., Lacroix, M. (2015). Synergistic effect of gamma (γ)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiol*, 46, 507-514.
- ICMSF (1986). International commission on microbiological specifications for foods. Microorganisms in foods 2: Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications, pp. 127–278.
- Kardowska-Wiater, M., Stasiak, D.M. (2011). Effect of ultrasound on survival of gram-negative bacteria on chicken skin surface. *Bull Vet Inst Pulawy*, 55, 207-210.
- Keklik, N.M., Demirci, A., Puri, V.M. (2010). Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light. *Poultry Sci*, 89, 570e581.
- Koluman, A., Dikici, A. (2016). Effect of nisin and gamma irradiation treatments on *Listeria monocytogenes* on some high economic valued aquaculture products. *Hacetatepe J Bio Chem*, 44(3), 245-257.
- Kramer, B., Wunderlich, J., Muranyi, P., 2017. Recent findings in pulsed light disinfection. *J Appl Microbiol.*, 122(4), 830-856.
- Kruk, Z.A., Yun, H., Rutley, D.L., Lee, E.J., Kim, Y.J. Jo, C. (2011). The effect of high pressure on microbial population, meat quality and sensory characteristics of chicken breast fillet. *Food Control*, 22, 6-12.
- Kundu, D., Gill, A., Lui, C., Goswami, N., Holley, R. (2014). Use of low dose e-beam irradiation to reduce *E.coli* O157:H7, non-O157 (VTEC) *E.coli* and *Salmonella* viability on meat surfaces. *Meat Sci*, 96, 413-418.
- Lazaro, C.A., Conte-Junior, C.A., Monteiro, M.L.G., Canto, A.C.V.S., Costa-Lima, B.R.C., Mano, S.B., Franco, R.M. (2014). Effects of ultraviolet light on biogenic amines and other quality indicators of chicken meat during refrigerated storage. *Poultry Sci*, 93, 2304-2313.
- Lee, E-S., Park, S.Y., Ha, S-D. (2015). Effect of UV-C light on the microbial and sensory quality of seasoned dried seafood. *Food Sci Technol Int*, 22(3), 213–220.
- Lerasle, M., Federighi, M., Simonin, H., Anthoine, V., Reze, S., Cheret, R., Guillou, S. (2014). Combined use of modified atmosphere packaging and high pressure to extend the shelf-life of raw poultry sausage. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 23, 54–60.
- Li, S., Kundu, D., Holley, R.A. (2015). Use of lactic acid with electron beam irradiation for control of *Escherichia coli* O157:H7, non-O157 VTEC *E.coli*, and *Salmonella* serovars on fresh and frozen beef. *Food Microbiol*, 46, 34-39.
- Li, X., Farid, M. (2016). A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. *J Food Eng*, 182, 33-45.
- Lin, D., Yan, M., Lin, S., Chen, S. (2014). Increasing prevalence of hydrogen sulfide negative *Salmonella* in retail meats. *Food Microbiol*, 43, 1-4.
- Lung, H-M., Cheng, Y-C., Huang, H-W., Yang, B.B., Wang, C-Y. (2015). Microbial decontamination of food by electron beam irradiation. *Trends Food Sci Technol*, 44, 66-78.
- McLeod, A., Liland, K.H., Haugen, J-E., Sorheim, O., Myhrer, K.S., Holck, A.L. (2017). Chicken filets subjected to UV-C and pulsed UV light: Reduction of pathogenic and spoilage bacteria, and changes in sensory quality. *J Food Saf*, 38, e12421.
- Medina-Meza, I.G., Barnaba, C., Barbosa-Cánovas, G.V. (2014). Effects of high pressure

- processing on lipid oxidation: A review. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 22, 1-10.
- Nagarajarao, R.C. (2016). Recent advances in processing and packaging of fishery products: A review. *Aquatic Procedia*, 7, 201-213.
- Nicorescu, I., Nguyen, B., Chevalier, S., Orange, N. (2014). Effects of pulsed light on the organoleptic properties and shelf-life extension of pork and salmon. *Food control*, 44, 138-145.
- Özer, N.P., Demirci, A. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. *Int J Food Sci Technol*, 41, 354-360.
- Park, S.Y., Ha, S-D. (2015). Ultraviolet-C radiation on the fresh chicken breast: Inactivation of major foodborne viruses and changes in physicochemical and sensory qualities of product. *Food Bioproc Tech*, 8, 895-906.
- Pan, Y., Sun, D-W., Han, Z. (2017). Applications of electromagnetic fields for nonthermal inactivation of microorganisms in foods: An overview. *Trends Food Sci Technol*, 64, 13-22.
- Panwar, R., Grover, C.R., Kumar, N. (2015). Microbial decontamination by novel technologies-potential for food preservation. *Indian Food Ind Mag*, 34(6), 24-32.
- Pillai, S., Shayanfar, S. (2017). Electron beam technology and other irradiation technology applications in the food industry. *Top Curr Chem*, 375(6).
- Pingen, S., Sudhaus, N., Becker, A., Krischek, C., Klein, G. (2016). High pressure as an alternative processing step for ham production. *Meat Sci*, 118, 22-27.
- Pinon, M., Paniwnyk, L., Alarcon-Rojo, A., Renteria, A., Nevarez, V., Janacua-Vidales, H., Mason, T. (2012). Power ultrasound effect on poultry meat microbial flora. 13th Meeting of the European Society of Sonochemistry, 1 - 5 July 2012, Lviv, Ukraine, 182-183p.
- Rajkovic, A., Smigic, N., Devlieghere, F. (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *Int J Food Microbiol*, 141, 29e42.
- Rajkovic, A., Tomasevic, I., Smigic, N., Uyttendaele, M., Radovanovic, R., Devlieghere, F. (2012). Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. *J Food Eng*, 100, 446-451.
- Rajkovic, A., Tomasevic, I., Meulenaer, B., Devlieghere, F. (2017). The effect of pulsed UV light on *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal enterotoxin A* on sliced fermente salami and its chemical quality. *Food Control*, 73, 829-837.
- Rodionova, K.O., Paliy, A.P. (2016). The effectiveness of application ultraviolet radiation for the sanitation of production premises of meat processing enterprises. *J Vet Med, Biotechnology and Biosafety*, 2(4), 20-24.
- Saif, S.M.H., Lan, Y., Williams, L.L., Joshee, L., Wang, S. (2007). Reductions of *Escherichia coli* O157:H7 on goat meat surface with pulsed dc square wave signal. *J Food Eng*, 77, 281-288.
- Silva, M.A., Costa, M.C.V.V., Solidonio, E.G., Junior, C.E.O.C., Sena, K.X.F.R., Colaço, W. (2015). Reduction of *Staphylococcus* spp. in jerked beef samples after irradiation with Co-60. International Nuclear Atlantic Conference (INAC), 4-9 October, Sao Paulo, Brazil.
- Singh, P.K., Verma, A.K., Ranjan R., Singh, T.P., Kumar, D., Kumar, P. (2015). Non thermal preservation of meat by irradiation: A review. *J Food Res Technol*, 3(1), 07-13.
- Sommers, C.H., Sheen, S. (2015). Inactivation of avirulent *Yersinia pestis* on food and food contact surfaces by ultraviolet light and freezing. *Food Microbiol*, 50, 1-4.
- Sommers, C.H., Scullen, O.J., Sheen, S. (2016). Inactivation of uropathogenic *Escherichia coli* in ground chicken meat using high pressure processing and gamma radiation, and in purge and chicken meat surfaces by ultraviolet light. *Frontiers in Microbiol*, 7(413).
- Sommers, C., Sheen, S., Scullen, O.J., Mackay, W. (2017). Inactivation of *Staphylococcus saprophyticus* in chicken meat and purge using thermal processing,

- high pressure processing, gamma radiation, and ultraviolet light (254 nm). *Food Control*, 75, 78e82.
- Stachelska, M.A., Stankiewicz-Szymczak, W., Jakubczak, A., Swislocka, R., Lewandowski, W. (2012). Influence of pulsed electric field on the survival of *Yersinia enterocolitica* in minced beef meat. *Aparatura Badawcza I Dydaktyczna*, 17, 13-17.
- Stoica, M., Mihalcea, L., Borda, D., Alexe, P. (2013). Non-thermal novel food processing technologies. An overview. *J Agroalimnet Proc Technol*, 19(2), 212-217.
- Stratakos, A.C., Koidis, A. (2015). Suitability, efficiency and microbiological safety of novel physical technologies for the processing of ready-to-eat meals, meats and pumpable products. *Food Sci Technol*, 50, 1283-1302.
- Tarek, A.R., Rasco, B.A., Sablani, S.S. (2015). Ultraviolet-C light inactivation kinetics of *E. coli* on bologna beef packaged in plastic films. *Food Bioproc Tech*, 8, 1267-1280.
- Troy, D.J., Ojha, K.S., Kerry, J.P., Tiwari, B.K. (2016). Sustainable and consumer-friendly emerging technologies for application within the meat industry: An overview. *Meat Sci*, 120, 2-9.
- Turantas, F., Kilic, G.B., Kilic, B., 2015. Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. *Int J Food Microbiol*, 198, 59-69.
- Valdramidis, V.P., Patterson, M.F., Linton, M. (2015). Modelling the recovery of *Listeria monocytogenes* in high pressure processed simulated cured meat. *Food Control*, 47, 353–358.
- Wu, X., Narsimhan, G. (2017). Synergistic effect of low power ultrasonication on antimicrobial activity of melittin against *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Sci Technol*, 75, 578–581.
- Yang, S., Sadekuzzaman, M., Ha, S-D. (2017). Reduction of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts by combined treatment with UV-C light and bacteriophage ListShield. *LWT - Food Sci Technol*, 86, 193-200.
- Yeh, Y., Moura, F.H., Van Den Broek, K., Mell, A.S. (2018). Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella* populations in ground beef. *Meat Sci*, 139, 44-48.
- Zhou, G.H., Xu, X.L., Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat-A review. *Meat Sci*, 86(1), 119-128.
- Zinoviadou, K.G., Galanakis, C.M., Brncic, M., Grimi, N., Boussetta, N., Mota, M.J., Barba, F.J. (2015). Fruit juice sonication: Implications on food safety and physicochemical and nutritional properties. *Food Res Int*, 77, 743-752.

COMPARISON OF VITAMIN, PEPTIDE AND MALONDIALDEHYDE CONTENT OF DIFFERENT EGGS

Aminu Haruna Tela, Fikret Karatas*, Sinan Saydam
Fırat University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Elazığ, Turkey

Received / Geliş: 21.06.2018; Accepted / Kabul: 09.02.2019 Published online / Online baskı: 10.03.2019

Haruna Tela, A., Karatas, F., Saydam, S. (2019). Comparison of vitamin, peptide and malondialdehyde content of different eggs. GIDA (2019) 44 (2): 216-225 doi: 10.15237/gida.GD18066

Haruna Tela, A., Karatas, F., Saydam, S. (2019). Farklı yumurtaların vitamin, peptid ve malondialdehit içeriğinin karşılaştırılması. GIDA (2019) 44 (2): 216-225 doi: 10.15237/gida.GD18066

ABSTRACT

In this work, vitamin A, E, C, MDA, beta-carotene, lycopene, glutathione and ghrelin levels of local chicken (organic), farm chicken, duck, quail and goose eggs were determined by HPLC. The amount of vitamin A and E found to be higher in the farm chicken egg than other eggs. β -carotene and lycopene found to be the higher ($P<0.005$) in the organic chicken egg. On the other hand, vitamin C, ghrelin, GSSG and MDA found to be higher in the quail's egg, but GSH was the higher in goose egg. Vitamin A and GSSG were lowest in the organic chicken egg while vitamin E was the lowest ($P<0.005$) in the quail's egg. The amount of vitamin C and β -carotene and MDA were found to be lowest in goose egg. Also, lycopene and GSH were found to be lowest in the duck egg, but ghrelin was found lowest ($P<0.005$) in the farm chicken egg.

Keywords: Egg, vitamin, β -carotene, lycopene, ghrelin, malondialdehyde, glutathione.

FARKLI YUMURTALARIN VİTAMİN, PEPTİD VE MALONDİALDEHİT İÇERİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZ

Bu çalışmada, köy tavuğu (organik), çiftlik tavuğu, ördek, bıldırcın ve kaz yumurtalarındaki A, E, C vitaminleri, malondialdehit (MDA), beta-karoten, likopen, glutatyon ve grelin miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Çiftlik tavuğu yumurtasındaki A ve E vitamini miktarlarının daha yüksek β -karoten ve likopen miktarlarının ise organik tavuk yumurtasında daha yüksek ($P<0.005$) olduğu belirlenmiş. Diğer taraftan C vitamini, grelin, GSSG ve MDA bıldırcın yumurtasında daha yüksek, fakat GSH miktarının ise gaz yumurtasında daha fazla olduğu belirlendi. Bulgularımız, organik tavuk yumurtasındaki A vitamini ve GSSG miktarının daha düşük ($P<0.005$) olduğunu, E vitamini miktarının ise bıldırcın yumurtasında daha düşük olduğunu göstermektedir. Kaz yumurtasında C vitamini, β -karoten ve MDA'nın daha düşük olduğu belirlendi. Diğer taraftan, likopen ve GSH'nin ördek yumurtasında daha düşük iken, çiftlik tavuğu yumurtasındaki grelin miktarı daha düşük ($P<0.005$) bulunmuştur. Sonuç olarak bıldırcın yumurtasındaki MDA ve GSSG değerlerinin diğer yumurtalara göre daha yüksek olması, bıldırcınların yaşadığı ortamın kuşlar üzerinde stres oluşturması ile açıklanabilir.

Anahtar kelimeler: Yumurta, vitamin, β -karoten, likopen, grelin, malondialdehit, glutatyon.

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ fkaratas@firat.edu.tr

☎ (+90) 506 302 4088

☎ (+90) 424 237 0000/3682

INTRODUCTION

The egg is highly nutritious and mainly used for breakfast, home meal preparation and baking. It contains great amount of high-quality protein and significant amounts of several vitamins (Gutierrez et al., 1996). Egg consumption is a popular choice for good nutrients which they are the variety as, chicken, duck and quail and among the most often humanly consumed is the chicken egg, typically unfertilized (Applegate, 2000). Regular consumption of quail eggs helps fight against many diseases which are a natural combatant against digestive tract disorders such as stomach ulcers and anemia quail eggs strengthen immune system, increase brain activity and stabilize the nervous system. They reduce anemia by increasing the level of hemoglobin in the body while removing toxin and heavy metals (Tunsaringkarn et al., 2013; Emilia et al., 2016). Chinese use quail eggs to treat tuberculosis, asthma and even diabetes. In addition, quail eggs can also be used to help to relive the pain of kidney, liver and gallbladder stones. The nutritional value of quail egg is much higher than those offered by other eggs which they are rich sources of antioxidants, minerals, vitamins, and nutrition than other foods (Tunsaringkarn et al., 2013). Moreover, egg contain substances with biological activities and functions, i.e. immune proteins, enzymes antimicrobial immunomodulatory, anticancer, antihypertensive activities, protease inhibitors, and functional lipids, highlighting the importance of egg (Kovacs-Nolan et al., 2005). It was reported that vitamins A, D, E, K and B group together with unsaturated fatty acids, cholesterol, choline, iron, calcium, phosphorus, selenium and zinc are reported to be rich in eggs (Kerver et al., 2002; Barboza et al., 2009). Carotenoids, such as β -carotene and lycopene, are important components of antioxidant defense against lipid peroxidation in living cells (Agarwal et al., 2005). Antioxidant peptides from egg proteins have also been reported (Huang et al., 2010). Apart from proteins, other antioxidant compounds in animal tissues such as vitamin E and ascorbic acid are well-known for their antioxidant properties (Sies & Stahl, 1995). It was reported that the chicken fed with rich in antioxidants feed to increase the

amount of antioxidants in egg yolk (McGraw et al., 2005; Rubolini et al., 2006). The color of egg yolk is an important factor in consumer's acceptance of a product. Desirable egg yolk color varies from market to market, but yellow to golden colors are usually considered as an indication of better egg quality. The natural color of egg yolks is a result of carotenoid accumulation in the yolk. Hens cannot able to synthesize color pigments but they have ability to transport pigments from the ingested feed to the yolk, therefore the carotenoid profile of yolk reflects the carotenoid profile of diets (Karadas et al., 2006).

Nowadays, commercially available eggs are supplied from farms that breed poultry in cages or free range farms in which birds are fed by specially prepared feed. In this study, it is aimed to determine the amount of vitamins, lycopene, β -carotene, ghrelin, malondialdehyde, reduced and oxidized glutathione, in the hens and quails' eggs that are grown in farm conditions, and compare the results with the naturally grown birds egg (village hens, duck and goose) results.

MATERIALS AND METHODS

Egg Materials

In this study, the fresh eggs were purchased from local markets in Elazig, Turkey. Five type of eggs were used, namely, farm chicken eggs, the village chicken eggs (organic), duck eggs and quail eggs were used throughout the experiment.

The production date of the farm and quail eggs was checked and obtained according to their daily production. Goose, duck and village hens' eggs were freshly collected daily and analyzed. Before the analysis, the yolk, white and chalaza of the egg were carefully separated. Then, the yolk was taken by injecting the yolk with the syringe and prepared for analysis. The analyses were done in both the yolk and albumen. The analyzes were run in three parallel for each sample.

Determination of Vitamins A, E, β -Carotene and Lycopene

A fresh egg yolk samples (5.0 g) were homogenized. 2.0 g of homogenate was taken

and. 6.0 mL of ethanol was added then the suspension was vortexed and centrifuged for five minutes at 4000 rpm. The solution was filtered (Whatman No 1). 0.5 mL of n-hexane was added to the filtrate, vortexed then n-hexane phase was extracted. This extraction process was replicated twice and the n-hexane phases were combined and dried with the stream of nitrogen to dryness. The residues were dissolved in 0.50 mL of methanol and analyzed by HPLC. The Supelcosil LC-18 column (25.0 cm x 4.60 mm x 5.0 µm) was used in the determination of vitamins A (retinol), E (α -tocopherol), lycopene and β -carotene. Acetonitrile: methanol: water (63:33:40 v/v) used as a mobile phase with the flow rate of 1.5 mL/min. PDA detector was used for α -tocopherol (296 nm), for retinol (326 nm), for lycopene (475 nm) and for β -carotene (470 nm) (Catignani, 1983; Miller et al., 1984; Sigma-Aldrich 2005-2006).

Determination of Vitamin C, Ghrelin, Glutathione and Malondialdehyde

To precipitate the proteins from egg yolk, 1.0 g of egg yolk was taken and 0.5 mL, 0.5 M HClO₄ was added then vortexed. Each sample was made up to 5.0 mL with deionized water and centrifuged for 15 minutes at 4000 rpm, then the supernatant was filtered (Whatman No 1). The filtrate was divided into three equal portions. The first portion was used for vitamin C while the second and third portions were used for ghrelin, glutathione and malondialdehyde (MDA) determination. Vitamin C, Ghrelin, Glutathione (GSH and GSSG), and MDA were determined according to Cerhata et al. (1992), Aydin et al. (2008), Dawes (2000), Karatas at al. (2002) respectively. The Utisil-XB-C-8 (25 cm, 4.6 mm ID, 5 µm) Column was used for the determination of glutathione and ghrelin with the flow rate of 1.5 mL/minute. The vitamin C and MDA were determined by Inertsil ODS-4 (5 mm in 4.60×150 mm) with the flow rate of 1.5 mL/minute.

Equipment and Chemicals

Standard reagents were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co.). All the chemical used in the analysis were of analytical grade and obtained from Merck and Sigma Chemicals.

Double distilled water was used throughout the analysis. HPLC was performed with the Shimadzu Prominence-I LC-2030C 3D Model with PDA detector.

Statistical Analysis

All measurements were triplicated. The statistical analysis of results obtained was performed the PC running on Windows 10 with SPSS 10.0 and for the variance analysis and LSD, ANOVA multiple comparison tests were performed in between $p < 0.05$ to $p < 0.005$ level.

RESULTS AND DISCUSSION

Vitamins are organic compounds that occur in metabolism. Deficiency of vitamins in living organism causes disorders. The majority of vitamins in metabolism must be taken outside sources. Eggs are said to be rich in many vitamins Hencken, (1992). Irie et al. (2010) reported that the amount of retinol in chicken, quail and duck eggs yolk were 4.97 ± 0.72 ; 8.96 ± 0.57 and 2.67 ± 1.01 µg/g respectively. Akdemir et al. (2012) mentioned that vitamin A in egg yolk 10.43 µg/g. We found that the vitamin A in farm, organic, duck, quail, and goose eggs yolk were 6.07 ± 0.70 ; 2.33 ± 0.33 ; 2.77 ± 0.39 ; 3.62 ± 0.47 and 4.64 ± 0.60 µg/g respectively (Figure 1-5 and Table 1). To be able to show all findings in the same chart some parameters were multiplied or divided by the coefficient of 10 or even 100. For example; while creating the chart of Vitamin C, beta-carotene, lycopene, ghrelin and MDA values are multiplied by 10 and GSH and GSSG graphics were obtained by dividing the value of GSH and GSSG by 10. It appears to be consistent with the literature value of vitamin A in different eggs. In terms of farm eggs, vitamin seems to be higher than the other eggs. The differences of vitamin A in eggs may be due to the differences in the type of birds, its environment or its nutrition.

Marques et al. (2011) reported that the amount of vitamins A and E in the quail's egg as 8.05 and 0.19 mg/g respectively. The amount of retinol in the egg yolk was reported to be 12.97 ± 2.69 µg/g and the amount of vitamin E was 88.69 ± 21.07 µg/g (Hargitai et al., 2016). Murcia et al. (1999) found that the amount of vitamin E in the egg

yolk was 0.61 µg/g. The findings of vitamin E in egg yolk of farm chicken egg, organic egg, duck egg, quail and goose eggs; were determined to be 3.33±0.42; 2.88±0.46; 0.40±0.07; 0.32±0.05 and 0.55±0.12 µg/g respectively (Figure 1-5 and Table

1). In comparison to the literature values, our findings show that the farm chicken eggs seem to be greater in vitamin E than other eggs.

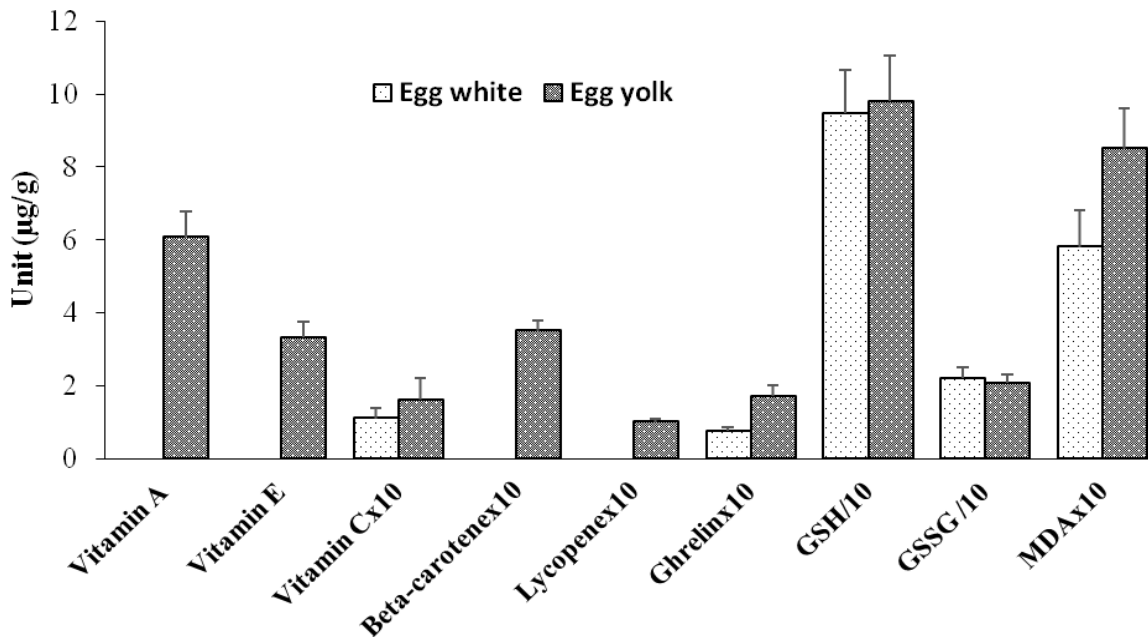


Figure 1. The amounts of vitamin A, E, C, β-carotene, lycopene, ghrelin, MDA, GSH and GSSG in farm chicken eggs.

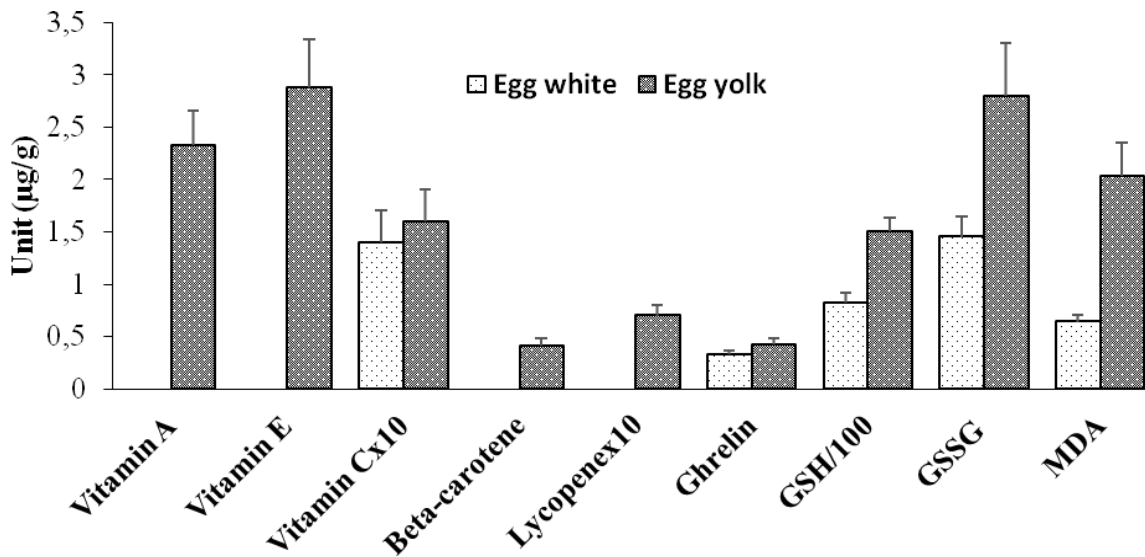


Figure 2. The amounts of vitamin A, E, C, β-carotene, lycopene, ghrelin, MDA, GSH and GSSG in local chicken eggs (organic).

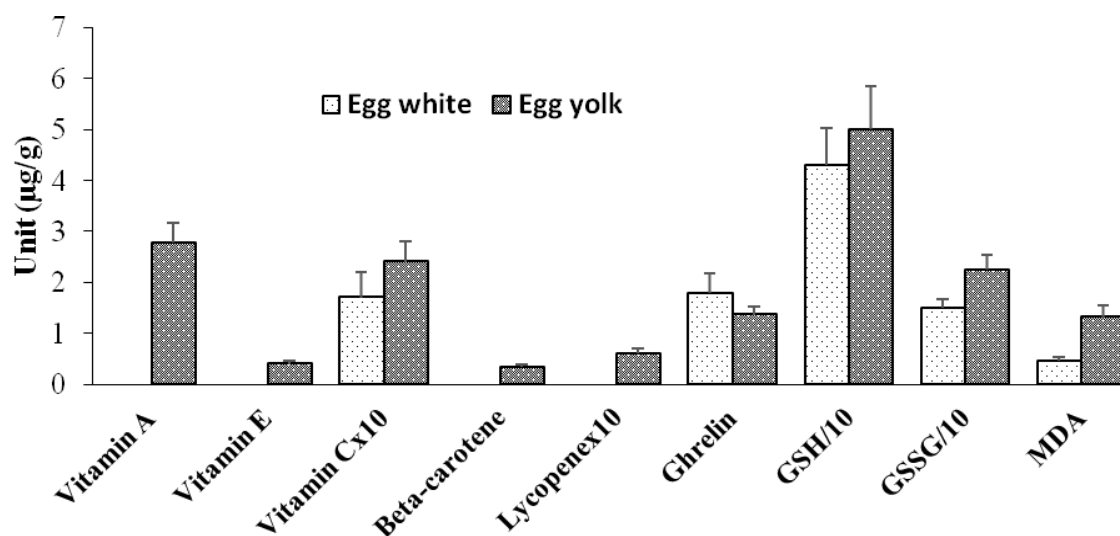


Figure 3. The amounts of vitamin A, E, C, β -carotene, lycopene, ghrelin, MDA, GSH and GSSG in duck eggs

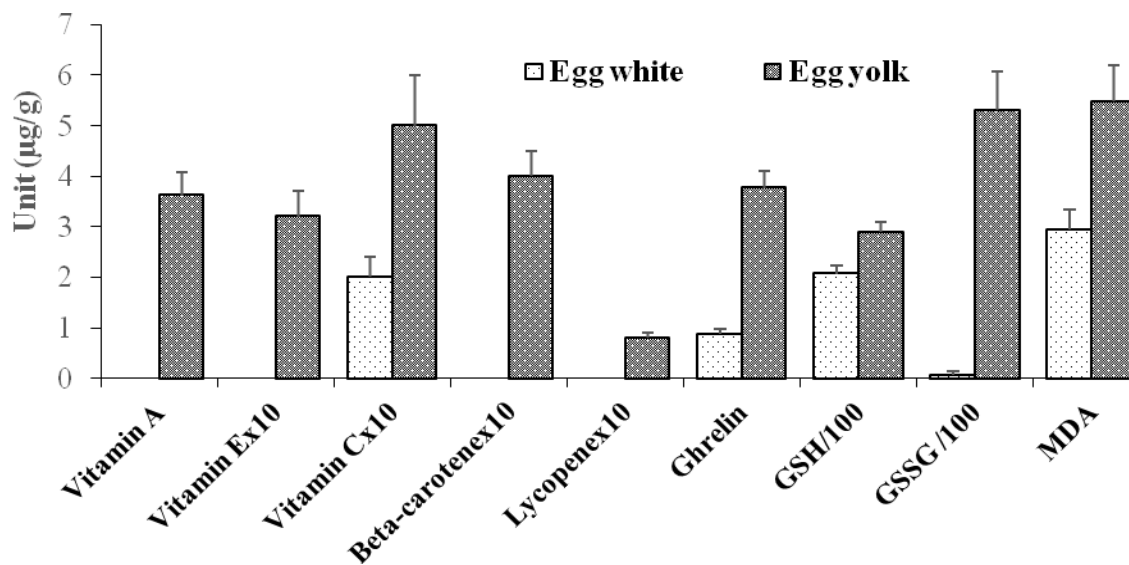


Figure 4. The amounts of vitamin A, E, C, β -carotene, lycopene, ghrelin, MDA, GSH and GSSG in quail eggs.

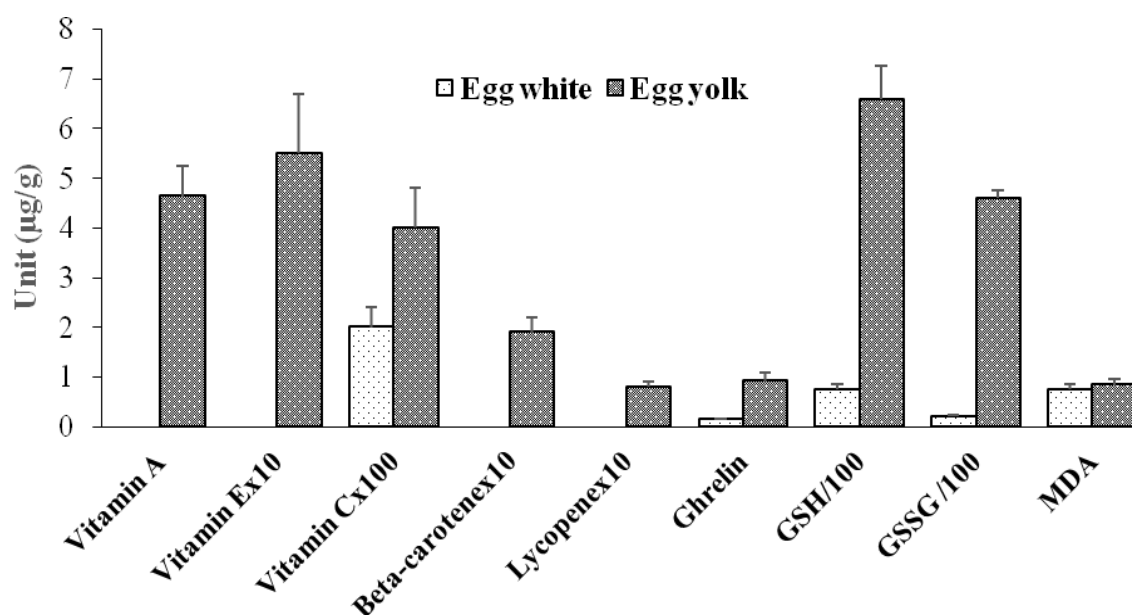


Figure 5. The amounts of vitamin A, E, C, β -carotene, lycopene, ghrelin, MDA, GSH and GSSG in goose eggs

Table 1. Some parameters in the yolk of different eggs

	Farm chicken	Local chicken (organic)	Duck	Quail	Goose
Vitamin A	6.07±0.70*	2.33±0.33***	2.77±0.39***	3.62±0.47**	4.64±0.60**
Vitamin E	3.33±0.42*	2.88±0.46*	0.40±0.07***	0.32±0.05***	0.55±0.12***
Vitamin C	0.16±0.06**	0.16±0.03**	0.24±0.04**	0.50±0.10*	0.04±0.08***
β -carotene	0.35±0.03*	0.41±0.07*	0.34±0.04*	0.40±0.05*	0.19±0.03***
Lycopene	0.10±0.01*	0.07±0.01**	0.06±0.01**	0.08±0.01**	0.08±0.01**
Ghrelin	0.17±0.03***	0.42±0.06***	1.36±0.16**	3.77±0.34*	0.92±0.16***
GSH	98.0±12.6***	150±14**	50.0±8.6***	290.0±20.0**	659.0±16.0*
GSSG	20.70±2.50**	2.80±0.50***	22.5±2.8**	530.0±77.0*	460.0±16.0*
MDA	0.85±0.11***	2.03±0.32**	1.32±0.23***	5.48±0.72*	0.84±0.13***

*) Greatest value in same line. In comparison with the largest value. **) $P < 0.05$, ***) $P < 0.005$ represents

Table 2. Some parameters in different white eggs

	Farm chicken	Local chicken (organic)	Duck	Quail	Goose
Vitamin C	0.11±0.03**	0.020±0.004***	0.17±0.05*	0.20±0.04*	0.020±0.004***
Ghrelin	0.075±0.010***	0.14±0.02***	1.78±0.39*	0.87±0.10**	0.14±0.02***
GSH	94.7±12.0**	75.0±12.0**	43.0±7.4***	207.0±17.0*	75.0±12.0**
GSSG	22.0±2.90*	20.0±3.0*	15.0±1.7**	6.0±0.7***	20.0±3.0*
MDA	0.58±0.10**	0.75±0.12**	0.46±0.08**	2.94±0.41*	0.75±0.12**

*) Greatest value in some line. In comparison with the largest value. **) $P < 0.05$, ***) represents $P < 0.005$

The egg yolk contains the small amount of vitamin C when compared to other vitamins (Nowaczewski et al., 2012). Our findings show that, vitamin C in egg yolk of farm chicken egg, organic chicken egg, duck egg, quail and goose eggs were 0.16 ± 0.06 ; 0.16 ± 0.03 ; 0.24 ± 0.04 ; 0.50 ± 0.10 and 0.04 ± 0.008 $\mu\text{g/g}$ respectively. The egg white of respective birds were 0.11 ± 0.03 ; 0.020 ± 0.004 ; 0.17 ± 0.05 ; 0.20 ± 0.04 and 0.020 ± 0.004 $\mu\text{g/g}$ respectively (Figure 1-5 and Table 2). It can be seen that vitamin C was the lowest in goose eggs which can be explained by the poor vitamin C source of fed goose consumed.

Beta-carotene is a precursor of vitamin A. It reported that poultry animals could not synthesize carotenoids but can be the reservoir of oxide carotenoids (Hencken, 1992). In our findings shows that the amounts of β -carotene in egg yolk of farm chicken egg, organic egg, duck egg, quail, and goose eggs were determined to be 0.35 ± 0.03 ; 0.41 ± 0.07 ; 0.34 ± 0.04 ; 0.40 ± 0.05 and 0.19 ± 0.03 $\mu\text{g/g}$ respectively (Figure 1-5 and Table 1). This result show that the goose eggs have the poorest beta-carotene (Figure 5 and Table 1). β -carotene in the chicken's egg was 0.19 while organic chickens' eggs were found to vary between 0.13 and 1.15 $\mu\text{g/g}$ in the yolk of the eggs and 1.74 $\mu\text{g/g}$ in the egg yolk of the duck egg and 0.12 $\mu\text{g/g}$ in the quail egg (Islam & Schweigert, 2015).

Jung-Woo (2008) chicken feeds with added lycopene reported that the amount 1.57 $\mu\text{g/g}$ in egg yolk. Rotollo et al. (2010) reported that dietary tomato extract affected values of egg yolk approximately 0.13% lycopene was transferred from the feed to the egg yolk. The dietary lycopene was reported to be incorporated into the egg yolk at values ranging from 0.12 to 0.16 $\mu\text{g/g}$ egg yolk. Our results showed that, lycopene in egg yolk were 0.10 ± 0.01 ; 0.07 ± 0.01 ; 0.06 ± 0.01 ; 0.08 ± 0.01 and 0.08 ± 0.01 $\mu\text{g/g}$ for farm chicken and organic chicken, duck, quail and goose eggs respectively (Figure 1-5 and Table 1). It can be seen from the results that the amount of lycopene in all type of eggs was relatively low. The low value of lycopene compared to the literature may

be due to the animals feeds without added lycopene.

It was found that the amount of ghrelin hormone in egg yolks of farm chicken egg, organic chicken egg, duck egg, quail and goose eggs were determined to be 0.17 ± 0.03 ; 0.42 ± 0.06 ; 1.36 ± 0.16 ; 3.77 ± 0.34 and 0.92 ± 0.16 $\mu\text{g/g}$ respectively. The amount of ghrelin in the egg white was observed to be 0.075 ± 0.010 ; 0.14 ± 0.02 ; 1.78 ± 0.39 ; 0.87 ± 0.10 and 0.14 ± 0.02 $\mu\text{g/g}$ respectively (Figure 1-5 and Table 1, 2). Yoshimura et al. (2009) reported the amount of ghrelin in egg yolk as 95 ± 5 pg/mL . We found that the amount of ghrelin was higher than the literature value.

The findings of GSH levels in egg yolks of our farm chicken, organic duck, quail and goose were determined 98.03 ± 12.60 ; 147.88 ± 14.06 ; 50.33 ± 8.65 ; 290.75 ± 20.13 and 659.25 ± 66.94 $\mu\text{g/g}$ respectively. The GSH levels in the same egg white were determined to be 94.73 ± 11.95 ; 82.16 ± 10.00 ; 43.02 ± 7.43 ; 206.74 ± 16.68 and 75.20 ± 12.15 $\mu\text{g/g}$ respectively. The amount of GSSG in egg yolk of farm chicken, organic chicken, duck quail and goose were determined to be 20.73 ± 2.50 ; 2.84 ± 0.53 ; 22.54 ± 2.80 ; 530.05 ± 77.03 and 460.02 ± 16.05 $\mu\text{g/g}$ respectively (Figure 1-5 and Table 1, 2). The heat stress applied to duck had an effect on nutritional metabolism and reduced production of the duck egg, it also decreased the amount of plasma GSH and increased the amount of MDA of these ducks (Ma et al., 2014). Both of GSH and GSSG concentrations in egg yolk are higher than in egg white. The redox potential of glutathione was reported to be the reduced and oxidized ratio of GSH/GSSG (Morel & Barouki, 1999). It was stated that basal levels of GSH/GSSG ratio are high but during the oxidative stress, this ratio is decreased (Chai et al., 1994). Additionally, environmental and physical factors influence that ratio of GSH/GSSG as well (Kocsy et al., 2001; Karatas et al., 2009).

Malondialdehyde (MDA) is the most important of reactive carbon compounds and widely used as a marker of lipid peroxidation (Cheesman & Slater,

1993). Bakalivanov et al. (2008) studied the amount of MDA depending on their storage time for frozen and dried eggs. The amount of egg depending on their storage time ranged from 0.1 - 0.2 µg/g were reported. Akdemir et al. (2012) mentioned the amount of MDA in egg yolk as 0.335 µg/g. Our results show that the amount of MDA in egg yolk of farm chicken, organic chicken, duck, quail, and goose eggs were 0.85±0.11; 2.03±0.32; 1.32±0.23; 5.48±0.72 and 0.84±0.13 µg/g found, respectively. The amount of MDA in the egg white were 0.58±0.10; 0.75±0.12; 0.46±0.08; 2.94±0.41 and 0.75±0.12 µg/g observed, respectively (Figure 1-5 and Table 1, 2). Our results were slightly higher than the literature value, particularly MDA in quail eggs considerably high (2.94±0.41 µg/g). Quails are wild birds and when kept in confined space they are said to be under stressed when both values of MDA and GSH/GSSG ratio were compared.

CONCLUSIONS

Egg is the good source of nutrients such as protein, vitamins, pro-vitamin, hormone, antioxidant and other compounds (such as vitamins A, E, C, β-carotene, lycopene, ghrelin, glutathione, and malondialdehyde) and other functional substances like lutein, bioactive proteins, and special fatty acids. Furthermore, these components are highly bioavailable from eggs. It was found that, vitamins A, E, C, β-carotene, lycopene, ghrelin, glutathione and MDA concentration differ with the egg type. There is significant amount of difference between the content of vitamin A, E and lycopene in farm chicken egg, on the other hand β-carotene is higher in organic chicken egg than farm chicken egg. Also the GSH content are higher in goose egg, while GSSG, ghrelin, MDA and vitamin C are found to be higher in quail egg. The differences in the amount of studied parameters in the egg can be explained by the diets or type of bird species. Higher concentration of MDA and GSSG in quail eggs can be explained by the living condition of the quails, in which they live in the confined environment that is more stressful. In addition, to increase the appeal of egg to consumer, nutritional values of bird feed are increased with the additives like, vitamins A and

E, therefore farm chicken egg showed higher concentration of vitamins A and C.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support of Firat University is greatly acknowledged (Project Number FUBAP FF.15.13).

REFERENCES

- Agarwal, A., Prahakaran, S.A., Said, T.M. (2005). Strategies to prevent oxidative stress induced injury to human spermatozoa. Review Article. *J Androl.* 26: 653-660.
- Akdemir, F., Orhan, C., Sahin, N., Sahin, K., Hayırlı, A. (2012). Tomato powder in laying hen diets: effects on concentrations of yolk carotenoids and lipid peroxidation. *Br Poult Sci.* 53: 675-680.
- Applegate, E. (2000). Introduction. nutritional and functional roles of eggs in the diet. *J Am Coll Nutr.* 19: 495-498.
- Aydin, S., Karatas., F., Geckil, H. (2008). Simultaneous quantification of acylated and desacylated ghrelin in biological fluids. *Biomed Chromatogr.* 22: 1354-1359.
- Bakalivanov, S., Tsvetkova, E., Bakalivanova, T., Tsvetkov, T., Kaloyanov, N., Grigorova, S., Alexieva, V. (2008). Characterization of freeze-dried egg melange long stored after irradiation. *Radiat Phys Chem.* 77: 58-63.
- Barboza, P.S., Parker, K.L., Hume, I.D. (2009). Metabolic constituents: water, minerals and vitamins. *Integrative wildlife nutrition book II. Germany: Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K;* pp. 157-206.
- Catignani, G.L. (1983). Simultaneous determination of retinol and α-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem.* 2914: 708-712.
- Cerhata, D., Bauerova, A., Ginter, E. (1994). Determination of ascorbic acid in blood serum using high-performance liquid chromatography and its correlation with spectrophotometric. *Caska-Slov-Farm.* 43(4): 166-168.

- Chai, Y.C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, R.B., Jr. Thomas, J.A. (1994). Sthiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch Biochem Biophys.* 310: 273-281.
- Cheesman, K.H., Slater, T.F. (1993). Introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 49: 481-493.
- Dawes, P., Dawes, E. (2000). *SGE Chromatography Products Catalog*. p.182.
- Emilia, N., Chukwumeka, M.S., Emmanuel, C.D., Johnkennedy, N., Pricilla, E. (2016). Quail eggs consumption and the levels of selected mineral in healthy students of Nnamdi Azikiwe University, Nnewi. *Int J Pharmacol Therapeutics.* 6(4): 1-5. eISSN 2249 – 6467.
- Gutierrez, M.A., Takahashi, H., Juneja, L.R. (1996). Nutritive evaluation of hen eggs in: Hen eggs their basic and applied science. *Eds T. Yamamoto. L.R. Juneja. H. Hatta. M. Kim. CRC Press Boca Raton.* pp. 25-35.
- Hargitai, R., Nyiri, Z., Eke, Z., Török, J. (2016). Effects of temperature and duration of storage on the stability of antioxidant compounds in egg yolk and plasma. *Physiol Biochem Zool.* 89(2): 161–167
- Hencken, H. (1992). Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poult Sci.* 71: 711-717.
- Huang, W.Y., Majumder, K., Wu, J. (2010). Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chem.* 123: 635–641.
- Irie, T., Sugimoto, T., Ueki, N., Senoo, H., Seki, T. (2010). Retinoid storage in the egg of reptiles and birds. *Comp Biochem Physiol. Part B,* 157: 113–118.
- Islam, K.M.S., Schweigert, F.J. (2015). Comparison of three spectrophotometric methods for analysis of egg yolk carotenoids. *Food Chem.* 172: 233–237
- Jung-Woo, K. (2008). Effects of lycopene as a feed additive on the quality of chicken eggs lycopene. *Korean J Poult Sci.* 35(3): 275-281.
- Karadas, F., Grammendis, E., Surai, P.F. (2006). Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition. *Br Poult Sci.* 47: 561-566.
- Karatas, F., Karatepe, M., Baysar, A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 311: 76-79.
- Karatas, F., Öbek, E., Karışlı, F. (2009). Antioxidant capacity of *lemna gibba* L. exposed to wastewater treatment. *J Ecol Eng.* 35: 1225–1230.
- Kerver, J.M., Park, Y., Song, W.O. (2002). The role of eggs in American diets: health implications and benefits. In: *Watson R. editor. Eggs and health promotion. Iowa: Blackwell Publishing Co.* pp. 9-18.
- Kocsy, G., Galiba, G., Brunold, C. (2001). Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol Plantarum.* 113: 158–164.
- Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., Mine, Y. (2005) Advances in the value of eggs and egg components for human health. Reviews. *J Agric Food Chem.* 53: 8421-8431
- Ma, X., Lin, Y., Zhang, H., Chen, W., Wang, S., Ruan, D., Jiang, Z. (2014). Heat stress impairs the nutritional metabolism and reduces the productivity of egg-laying ducks. *Anim Reprod Sci.* 145: 182–190.
- Marques, R.H., Gravena, R.A., Torre da Silva, J.D., Roccon, J., Picarelli, J., Hada, F.H., Sandra Aidar de Queiroz, S.A., Moraes, V.M.B. (2011). Effect of supplementation of diets for quails with vitamins A, D and E on performance of the birds and quality and enrichment of eggs. *Rev Bras Zootecn.* 40(6): 1222-1232
- McGraw, K.J., Adkins-Regan, E., Parker, R.S. (2005). Maternally derived carotenoid pigments affect offspring survival, sex ratio, and sexual attractiveness in a colorful songbird. *Naturwissenschaften.* 92: 375-380.

- Miller, K.W., Lorr, N.A., Yang, C.S. (1984). Simultaneous determination of plasma retinol α -tocopherol, lycopene, α -carotene, and β -carotene by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 138: 340-345.
- Morel, Y., Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.* 342: 481–496.
- Murcia, M.A., Martí'nez-Tomé', M., del Cerro, I., Sotillo, F., Ramírez, A. (1999). Proximate composition and vitamin E levels in egg yolk: losses by cooking in a microwave oven. *J Sci Food Agric.* 79: 1550-1556.
- Nowaczewski, S., Kontecka, H., Krystianiak, S. (2012). Effect of in ovo injection of vitamin C during incubation on hatchability of chickens and ducks. *Folia Biol (Krakow).* 60(1-2): 93-97
- Rotolo, L., Strazzullo, G., Pagella, M., Brugiapaglia, A., Pozzo, L., Schiavone, A. (2010). Effect of a tomato extract-supplemented diet on egg yolk pigmentation and lycopene transfer efficiency. *Italian J Food Sci.* 22(2): 180-185.
- Rubolini, D., Romano, M., Bonisoli Alquati, A., Saino, N. (2006). Early maternal, genetic and environmental components of antioxidant protection, morphology and immunity of Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*) chicks. *J Evol Biol.* 19: 1571-1584.
- Sies, H., Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, β -carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr.* 62: 1315–1321.
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH. *Supelco Chromatography Products for Analysis & Purification. Export Department Eschenstraße Taufkirchen.* p.131-169 Germany. 2005-2006.
- Tunsaringkarn, T., Tungjaroenchai, W., Siriwong, W. (2013). Nutrient benefits of quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) eggs. *IJSRP*, 3(5): 1-8
- Yoshimura, Y., Tsuyuki, C., Subedi, K., Kaiya, H., Sugino, T., Isobe, N. (2009). Identification of ghrelin in fertilized eggs of chicken. *J Poult Sci.* 46: 257-259.

TAZE KARİDESLERİN RAF ÖMRÜNÜN UZATILMASINDA SOĞAN KABUĞU EKSTRAKTININ ETKİSİ

İlknur Uçak*

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Niğde, Türkiye

Geliş / Received: 07.01.2019; Kabul / Accepted: 14.02.2019; Online baskı / Published online: 10.03.2019

Uçak, İ. (2019). Taze karideslerin raf ömrünün uzatılmasında soğan kabuğu ekstraktının etkisi. *GIDA* (2019) 44 (2): 226-237 doi: 10.15237/gida.GD19017

Uçak, İ. (2019). *The effects of onion peel extract in preventing shelf life of fresh shrimp*. *GIDA* (2019) 44 (2): 226-237 doi: 10.15237/gida.GD19017

ÖZ

Bu çalışmada japon karidesi (*Penaens japonicus*) ve yeşil kaplan karideslerinin (*Penaens semisulcatus*) raf ömrünün uzatılması amacıyla soğan kabuğu ekstraktının etkileri araştırılmıştır. Baş ve kabukları ayrılmış olan karides etleri %8 oranında soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş ve 8 gün $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ de depolanmıştır. Kontrol gruplarının toplam uçucu bazik azot (TVB-N) ve tiyobarbitürikasit (TBARS) değerleri ekstrakt ile muamele edilen gruplardan yüksek bulunmuştur. pH değerleri tüm gruplarda depolamanın sonuna kadar artış göstermiş, ancak bu artış kontrol gruplarında daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Toplam canlı sayısı (TVC) ve toplam psikrofilik canlı sayısı (PBC) başlangıçta japon karidesi ve yeşil kaplan karideslerinde sırası ile 2.95; 2.68 log kob/g ve 3.28; 2.95 log kob/g bulunmuş ve bu değerler depolama sonunda artış göstermiştir. Soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilen karideslerde TVC ve PBC değerleri depolama süresince 7 log kob/g limit değerini aşmamıştır. Bu çalışma sonuçları soğan kabuğu ekstraktının karideslerde kimyasal, mikrobiyal ve duyuşsal kalitenin korunmasında etkili bir doğal katkı maddesi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Karides, soğan kabuğu ekstraktı, mikrobiyal kalite, TVB-N, duyuşsal kalite

THE EFFECTS OF ONION PEEL EXTRACT IN PREVENTING SHELF LIFE OF FRESH SHRIMP

ABSTRACT

In this study, the effects of onion peel extract was investigated in order to increase the shelf life of japanese shrimp (*Penaens japonicus*) and green tiger shrimp (*Penaens semisulcatus*). Decapitated shrimps were treated with 8% onion peel extract and stored at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 8 days. The total volatile basic nitrogen (TVB-N) and thiobarbituric acid (TBARS) values of the control groups were found higher than those of the extract treated groups. The pH values showed increase in all groups until at the end of storage, but this increase was higher than those of the controls. The initial total viable count (TVC) and total psychrophilic bacteria count (PBC) were found as 2.95; 2.68 and 3.28; 2.95 log cfu/g in japanese and green tiger shrimp, respectively, and these values showed increase at the end of the storage. TVC and PBC counts of the shrimps treated with onion peel extract did not exceed the limit value of 7 log cfu/g during the storage period. Based on the results of this study, it might be thought that onion peel extract can be used as an effective natural additive for preserving chemical, microbiological and sensory quality of shrimps.

Keywords: Shrimp, onion peel extract, microbiological quality, TVB-N, sensory quality

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ilknurucak@ohu.edu.tr

☎ (+90) 388 225 3044

☎ (+90) 388 225 4440

GİRİŞ

Crustacea sınıfının Decapoda takımında yer alan karidesler, ekonomik değeri yüksek olan kabuklu su ürünlerindedir (Salman, 1995). Karidesler protein, serbest amino asitler ve omega-3 yağ asitleri bakımından oldukça zengindir. Ancak, zengin besin kompozisyonunun yanında bozulmaya da oldukça hassas olup sınırlı raf ömrüne sahiptir. Post-mortem depolama boyunca enzimatik ve mikrobiyolojik aktiviteler nedeni ile çok çabuk bozulabilen (Aşık ve Candoğan, 2014) karideslerin yakalandıktan sonra kısa bir süre içinde düşük sıcaklıklarda korunmaları, dondurulmaları veya işlenmeleri gerekmektedir. Karideslerde tazeliğin korunması ve raf ömrünün artırılması amacı ile çeşitli antioksidan ve antimikrobiyal koruyucular kullanılmaktadır (Gökoğlu ve Yerlikaya, 2008; Nirmal ve Benjakul, 2011; Nirmal ve Benjakul, 2012). Ancak, tüketicilerin doğal ürünlere olan talebi ve sentetik koruyucular hakkındaki endişeleri nedeni ile yapılan çalışmalar yeni doğal kaynakların arayışı üzerine odaklanmaktadır.

Son yıllarda, gıda atıklarının ve yan ürünlerinin değerlendirilmesi ve bu ürünlerin gıdaların raf ömrünü uzatmada antioksidan ve antimikrobiyal olarak endüstriyel kullanımlarına olan ilgi artmaktadır. Soğan (*Allium cepa*) çok yönlü bir sebze olup hem taze hem de işlenmiş olarak tüketilebilmektedir. Ancak yüksek oranda flavonoid içeren soğan kabukları, soğanların işlenmesi sırasında atılmaktadır. Bu nedenle soğan kabuğu, bir gıda endüstrisi atığı olarak değerlendirilmekte ve uygun koşullarda atılmadığı takdirde çevresel kirliliğe neden olabilmektedir (Ifesan, 2017). Ayrıca soğan kabuğunun soğandan daha yüksek miktarda flavonoid (özellikle kuarsetin) içerdiği de bildirilmiştir (Cook ve Samman, 1996). Soğan kabuğunun antioksidan ve antimikrobiyolojik etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Sing vd., 2009; Nile vd., 2017; Kim vd., 2014; Ifesan, 2017). Ifesan (2017) soğan kabuğunun %80 etanol ile ekstraksiyonu sonucunda toplam fenolik madde içeriğini 664.3 µg ml/GA olarak bulmuştur. Bir başka çalışmada soğan kabuğunun %60 ve %80 etanolik ekstraksiyonu sonucu toplam fenolik madde içeriği sırası ile 549.2 ve 608.4 mg GA/g ve

antioksidan madde içeriği ise sırası ile 100.1 ve 50.2 µmol TEAC/g olarak bulunmuştur (Viera vd., 2017).

Soğan kabuğunun tüm bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, sentetik koruyuculara karşı alternatif doğal bir koruyucu olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla bu çalışmada, soğan kabuğu ekstraktının karideslerde soğuk depolama boyunca meydana gelen biyokimyasal ve mikrobiyolojik bozulmaları önlemede etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Soğan kabuğu ekstraktının hazırlanması

Soğan kabukları, Niğde ilinde yerel marketten toplanmış ve laboratuvara getirilerek iki kez çeşme suyu ile yıkanmıştır. Yıkanan soğan kabukları 40°C'ye ayarlanmış etüvde 48 saat süre ile kurutulmuş ve daha sonra blender yardımı ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen soğan kabukları erlenlere alınarak üzerine etanol çözeltisi (%70) eklenmiş ve Tabaraki vd. (2012)'nin belirttiği yöntemle göre ultrasonik destekli ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Soğan kabuğu etanol oranı 1:10, g/ml olarak belirlenmiştir. Daha sonra ekstrakte edilen örnekler filtre kağıdı ile süzülerek rotary evaporatörde (IKA, HB-10 digital, Germany) 45°C'de uçurularak soğan kabuğu ekstraktları elde edilmiştir. Ekstraktlar, kullanılmaya kadar -80°C derin dondurucuda (Symphony, VWR DW) muhafaza edilmiştir.

Örneklerin hazırlanması

Çalışmada, japon karidesi (JK) (*Penaeus japonicus*) ve yeşil kaplan karidesi (YK) (*Penaeus semisulcatus*) olmak üzere iki farklı tür karides kullanılmıştır. Karidesler Mersin ili limanından aynı gün yakalanmış olarak temin edilmiş ve yaklaşık 2 saat uzaklıkta bulunan Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi laboratuvarına buz içerisinde getirilmiştir. Örneklerin ortalama ağırlık ve boyları sırası ile japon karidesinde 15.5±1.32 cm ve 24±1.16 g, yeşil kaplan karidesinde 14.5±0.35 cm ve 22±2.43 g olarak ölçülmüştür. Karidesler baş ve kabuk kısımları alındıktan sonra yıkanmış ve ön denemeler sonucu belirlenen %8 (ml/g) oranında soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiştir. Ön

denemeler ile belirlenen bu oran karides etinin koku ve görünüş özellikleri üzerinde minimum olumsuz etkiye sahip olmuştur. Bir grup kontrol olarak ayrılmıştır. Tüm örnekler strafor tabaklar içerisine koyularak streç film ile kaplanarak $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'de depolanmıştır.

Toplam uçucu bazik azot (TVB-N) tayini

Homojenize edilen 10 g örneklerin uçucu baz içerikleri su buharı destilasyonu uygulanarak ayrılmış ve ayrılan bu bazlar 0.1 N HCl içerisinde toplanmıştır. Toplanan destilatlar 0.1 N NaOH ile titre edilmiş ve TVB-N miktarı mg/100 g olarak hesaplanmıştır (Schormüller, 1968).

Tiyobarbitürikasit (TBARS) analizi

Tiyobarbitürikasit değeri tayini Tarladgis vd. (1960) yöntemine göre yapılmıştır. 10 g karides eti alınarak 2.5 ml HCl (1:2 HCl:saf su) ile su buharı destilasyonu yapılmıştır. Elde edilen destilttan 5 ml alınıp 5 ml TBA reaktifi solüsyonu (0.288 g/100 ml) ile karıştırılmış ve reaksiyona girmesi amacıyla 110°C 'ye ayarlanmış su banyosunda 35 dk kaynatılmıştır. Hızla soğutulan örnekler, 538 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuçlar mg malondialdehit/kg örnek olarak ifade edilmiştir.

Mikrobiyolojik analizler

Örneklerden alınan 10 g üzerine 90 ml ringer solüsyonu eklenmiş ve stomacher yardımı ile 60 s homojenize edilmiştir. Aynı homojenattan diğer dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Bakterilerin sayımı için uygun dilüsyonlardan ekim yapılmıştır. Tüm mikrobiyal analizler 0,1 ml dilüsyon sıvısı alınarak yayma ekim şeklinde yapılmıştır. Toplam mezofil ve toplam psikrofil bakteri sayımında Plate Count Agar (PCA) kullanılmış ve sırası ile 35°C 'de 2 gün ve 7°C de 10 gün inkübe edilmiştir.

pH ölçümü

pH ölçümü için pH elektrodu saf su ile hazırlanan homojenata (1:1) daldırılmıştır. Tüm ölçümler, pH metre (Thermo Scientific Orion 2-star, Germany) kullanılarak oda sıcaklığında ($24\pm 1^\circ\text{C}$) gerçekleştirilmiştir.

Duyusal değerlendirme

Karides örneklerinin duysal değerlendirmesi Maqsood ve Benjakul (2011) tarafından belirlenen yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Yaşları 25-35 arasında değişen 10 adet panelist kullanılarak oda koşullarında gün ışığı altında duysal değerlendirme yapılmıştır. Örnekler koku, tekstür, renk, görünüş ve genel beğeni yönlerinden 9 puanlık hedonik skala kullanılarak analiz edilmiştir. 9-7 "çok iyi", 6.9-4.0 "iyi", 3.9-1.0 "bozulmuş" olarak değerlendirilmiştir (Amerina vd., 1965).

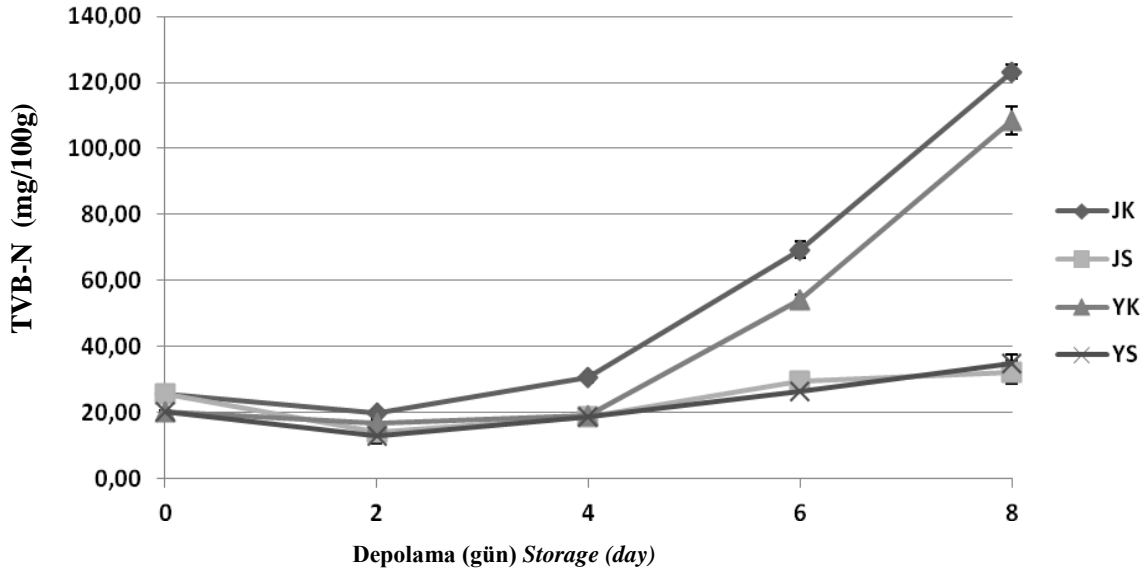
İstatistiksel analiz ve değerlendirmeler

Çalışma iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlara varyans analizi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulup, %5 önem düzeyinde karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler için SAS yazılımı (Statistical Analysis System, Cary, NC, USA) kullanılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Depolama boyunca toplam uçucu bazik azot (TVB-N) miktarında meydana gelen değişimler

Depolama süresince soğan kabuğu ekstraktı eklenmiş japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin TVB-N değerlerinde meydana gelen değişim Şekil 1'de verilmiştir. Depolamanın başında TVB-N değerleri japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinde sırası ile 25.61 ve 20.26 mg/100g olarak belirlenmiş ve depolama boyunca ekstrakt ilaveli gruplarda önemli derecede ($P < 0.05$) daha düşük bulunmuştur. TVB-N değerleri 2. günden sonra depolamanın sonuna kadar artış göstermiş ve depolama sonunda japon karidesi kontrol ve yeşil kaplan karidesi kontrol gruplarında sırası ile 123.29 ve 108.54 mg/100g olarak en yüksek ($P < 0.05$) değerlere ulaşmıştır. Soğan kabuğu ekstraktı ilave edilen karideslerde TVB-N değerleri depolama boyunca 35 mg/100g' geçmemiş ve bu nedenle "pazarlanabilir" özelliğini depolama sonuna kadar korumuştur. Kontrol grupları ise 6. günde bu değeri aşmıştır. Depolama sonunda en düşük TVB-N değeri soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesinde (32.20 mg/100g) gözlenmiştir.



Şekil 1. Japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin depolama süresince toplam uçucu bazik azot (TVB-N) değerlerinde meydana gelen değişimler. * JK: japon karidesi kontrol; JS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi; YK: yeşil kaplan karidesi kontrol; YS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş yeşil kaplan karidesi

Figure 1. Changes in total volatile basic nitrogen (TVB-N) values of japanese and green tiger shrimp during storage period. * JK: japanese shrimp control; JS: japanese shrimp treated with onion peel extract; YK: green tiger shrimp control; YS: green tiger shrimp treated with onion peel extract

Balıklardaki bakteriyel bozulma ve endojen enzimlerin aktivitesi ile beraber TVB-N miktarı artış göstermektedir. TVB-N analizi balığın tazeliğinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri olup (Lang, 1979; Vareltzis vd., 1997), genel olarak balık ve su ürünlerinde 25 mg/100g'a kadar TVB-N içeren örnekler 'çok iyi', 30 mg/100g'a kadar 'iyi', 35 mg/100g'a kadar 'pazarlanabilir' ve 35 mg/100g'dan fazla olanlar ise 'bozulmuş' olarak değerlendirilmektedirler (Huss, 1988). Chinese National standartlarına göre (GB2741-94), taze bir karideste TVB-N değeri 300 mg/100g'dan düşük olmalıdır.

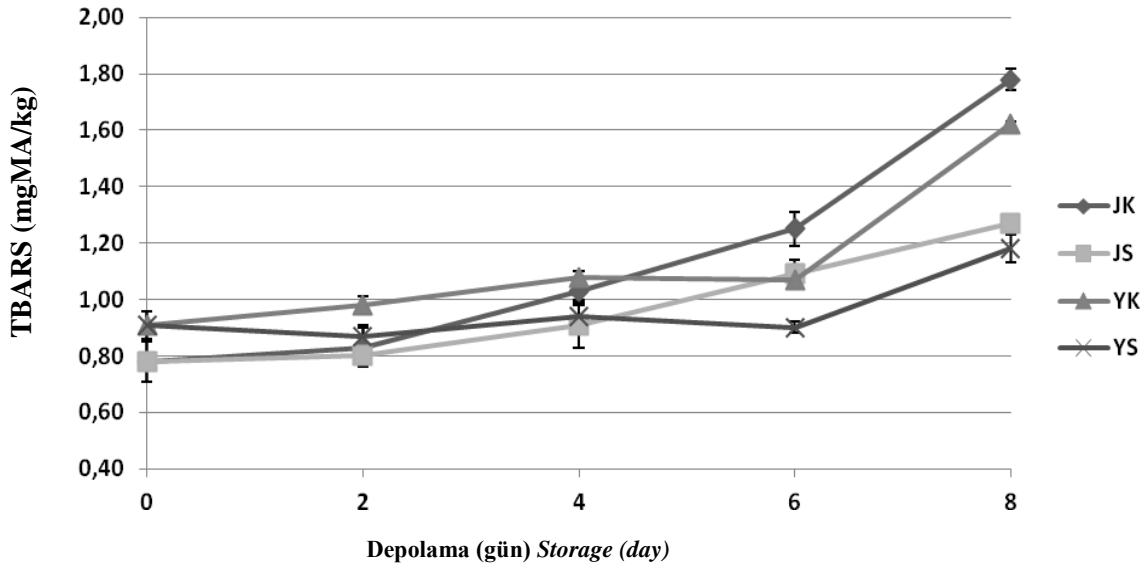
Patır vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada karides etinin başlangıç TVB-N değerinin 18.23 mg/100g olduğu bulunurken, Aşık (2009) tarafından sarımsak yağı içeren kitosan bazlı yenilebilir filmlerle kaplanan karideslerin TVB-N değerleri başlangıçta 20.72 mg/100g olarak bildirilmiştir. Soğukta depolanan karideslerin TVB-N değerleri depolamanın başında Varlık vd.

(2000) tarafından 22.95 mg/100g olarak bulunmuştur. Ayrıca Kalıştır (2008), karides marinatlari ile yaptığı çalışmada TVB-N değerlerinin marinat işlemi öncesinde 15.97 mg/100 olduğunu rapor etmişlerdir. Hocoğlu vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada gamma ışınlama işlemi yapılan ve -18°C' de 3 ay boyunca depolanan karideslerde kontrol grubunda TVB-N değerini depolamanın başında 9.41 mg/100 g olarak bulmuş ve depolama süresince dalgalanma gösteren bu değer depolamanın sonunda 12.33 mg/100g değerine ulaşmıştır. Jelatin bazlı portakal yaprağı uçucu yağı ile muamele ettikleri karides etinde kontrol grubunda başlangıç TVB-N değerini 17.14 mg/100g bulan Alparslan vd. (2016), depolama süresince artış gösteren bu değer depolamanın sonunda (12. gün) 41.27 mg/100g'a çıktığını tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar depolama boyunca tüm örneklerde TVB-N değerlerinde artış gözlemlendiğini göstermiş olup benzer sonuçlar Varlık vd. (2000), Sadok vd. (2004), Bilgin vd. (2006) tarafından da rapor edilmiştir.

Depolama boyunca TBARS değerinde meydana gelen değişimler

TBA değeri balık ve balık ürünlerinde koku, lezzet, tekstür ve renkte değişikliklerine yol açabilen lipit oksidasyonu derecesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Wenjiavd., 2013). Karides etinde 8 günlük depolama süresince TBARS değerlerinde meydana gelen değişimler Şekil 2'de verilmiştir. Depolamanın başında japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinde TBARS değerleri sırası ile 0.78 ve 0.91 mg MA/kg olarak bulunmuştur. Bu değerler depolamanın sonuna kadar artış

göstermiş ve 8. günde sırası ile 1.78 ve 1.62 mgMA/kg'a yükselmiştir. Depolama süresince önemli derecede ($P < 0.05$) en yüksek değerler her iki karides grubunda da kontrol örneklerinde gözlenmiştir. Soğan kabuğu ile ekstrakte edilmiş japon karidesinde depolama sonunda 1.27 mgMA/kg olarak gözlenen TBARS değeri yeşil kaplan karidesinde 1.18 mgMA/kg olarak bulunmuştur. Kontrol grupları ile kıyaslandığında soğan kabuğu ile ekstrakte edilen örneklerde daha düşük gözlenen TBARS değerleri, soğan kabuğu ekstraktının lipit oksidasyonu üzerinde etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 2. Japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin depolama süresince tiyobarbitürikasit (TBARS) değerlerinde meydana gelen değişimler.* JK: japon karidesi kontrol; JS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi; YK: yeşil kaplan karidesi kontrol; YS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş yeşil kaplan karidesi

Figure 2. Changes in thiobarbituric acid (TBARS) values of japanese and green tiger shrimp during storage period.* JK: japanese shrimp control; JS: japanese shrimp treated with onion peel extract; YK: green tiger shrimp control; YS: green tiger shrimp treated with onion peel extract

Aşık (2009) sarımsak yağı içeren kitosan kaplama ile kapladıkları karideslerde 0. gün TBARS değerini 0.35 mgMA/kg olarak bulmuşlardır. Cadun vd. (2005) antimikrobiyal ajanlar ekleyerek marine edilmiş karideste kalite değişimlerini incelemişlerdir. Başlangıçta karides etinde TBARS değerini 0.51 mgMA/kg olarak rapor etmişlerdir ve depolama süresince bu değerini marine edilmiş

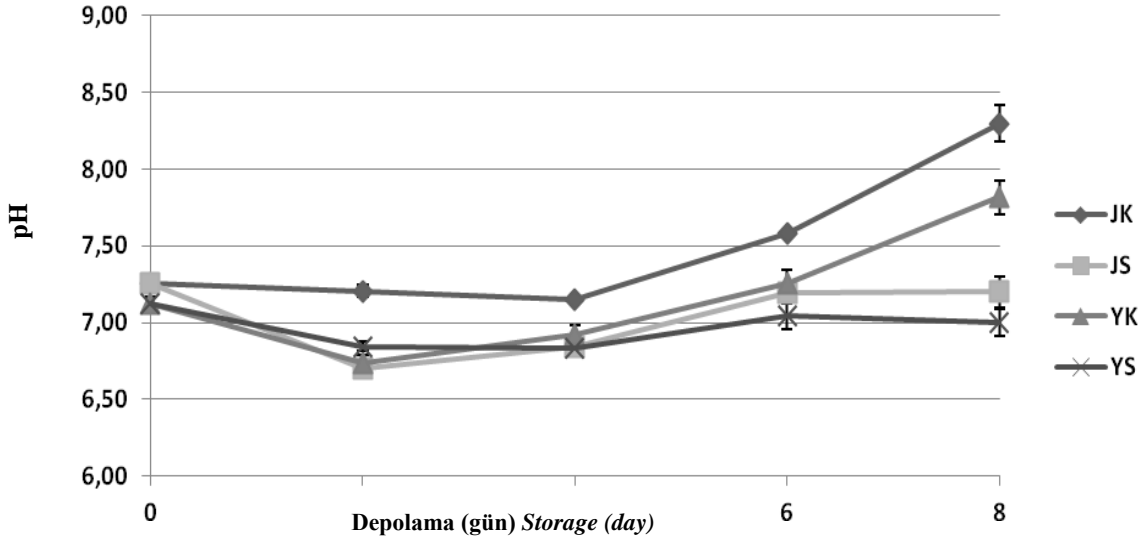
karideslerde önemli derecede artış gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Depolama boyunca pH değerinde meydana gelen değişimler

Soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş karides etinin depolama boyunca pH değerlerinde meydana gelen değişim Şekil 3'de verilmiştir. Başlangıç pH değeri japon karidesinde 7.26 ve

yeşil kaplan karidesinde 7.13 olarak gözlenmiştir. Her iki karides türünde de kontrol gruplarının pH değerleri soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilen grupların pH değerlerinde önemli düzeyde ($P < 0.05$) daha yüksek bulunmuştur. Depolama sonunda en yüksek pH değerleri sırası ile 8.30 ve 7.82 olarak japon karidesi kontrol ve yeşil kaplan karidesi kontrol gruplarında gözlenmiştir. Soğan Şekil 3

kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi ve yeşil kaplan karidesi gruplarında pH değerleri depolama sonunda sırası ile 7.20 ve 7.0 olarak bulunmuştur. Karides etinde pH değerinin genellikle 7.0-7.3 arasında değiştiği, depolama koşullarına bağlı olarak depolama süresince 7.5-7.7'ye kadar yükseldiği bildirilmektedir (Bayizit vd., 2003).



Şekil 3. Japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin depolama süresince pH değerlerinde meydana gelen değişimler.* JK: japon karidesi kontrol; JS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi; YK: yeşil kaplan karidesi kontrol; YS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş yeşil kaplan karidesi
Figure 3. Changes in pH values of japanese and green tiger shrimp during storage period.* JK: japanese shrimp control; JS: japanese shrimp treated with onion peel extract; YK: green tiger shrimp control; YS: green tiger shrimp treated with onion peel extract

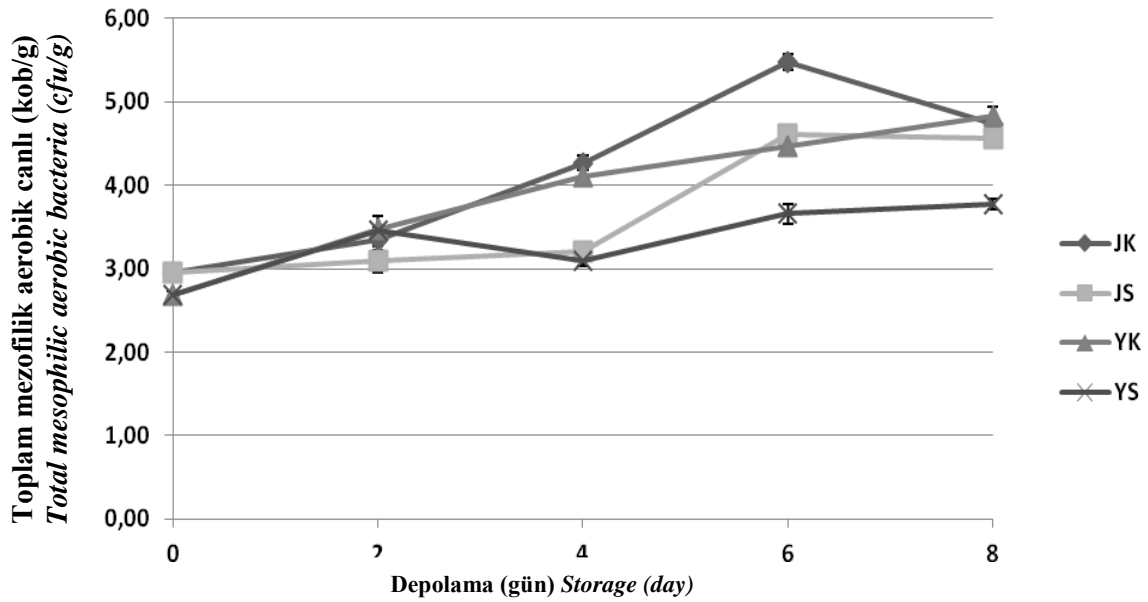
Kontrol gruplarında depolama sonunda pH değerlerinde gözlenen artışlar benzer çalışmalarda da gözlenmiştir. Zeng vd. (2005) farklı sıcaklıklarda (-1.5 ve +1.5°C) depoladıkları karides etinde (*Pandalus borealis*) pH değerini başlangıçta 7.41 olarak tespit etmişlerdir. Depolama sonunda 1.5°C' de depolanan örneklerin pH değerlerinin 8.26 ve -1.5°C' de depolanan örneklerin pH değerlerinin 7.98 olduğunu rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada buzdolabı koşullarında (4°C) depolanan kahverengi karideslerin (*Crangon crangon*) pH değerleri depolamanın başında 6.83 olarak gözlenirken, depolamanın sonunda (5.gün) 7.95 olarak bulunmuştur (Bilgin vd., 2006). Çolakoğlu

vd. (2006) taze karides etinde (*Parapenaeus longirostris*) pH değerinin başlangıçta 7.60 olduğunu bildirirken, depolamanın 5. gününde bu değer 8.06'ya çıktığını tespit etmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalar depolama sonunda karides etinde artış gösteren pH değerlerinin mevcut çalışmayı desteklediğini göstermektedir. Alparslan vd. (2016)'nin yaptığı çalışmada jelatin kaplama uygulanan karides örneklerinin kontrol grubunda başlangıçta pH değerini 6.47 olarak belirlerken, depolamanın sonuna kadar artış gösteren pH değeri depolama sonunda (14. gün) 8.55 olarak bulunmuştur.

Depolama Esnasında Meydana Gelen Mikrobiyolojik Değişimler

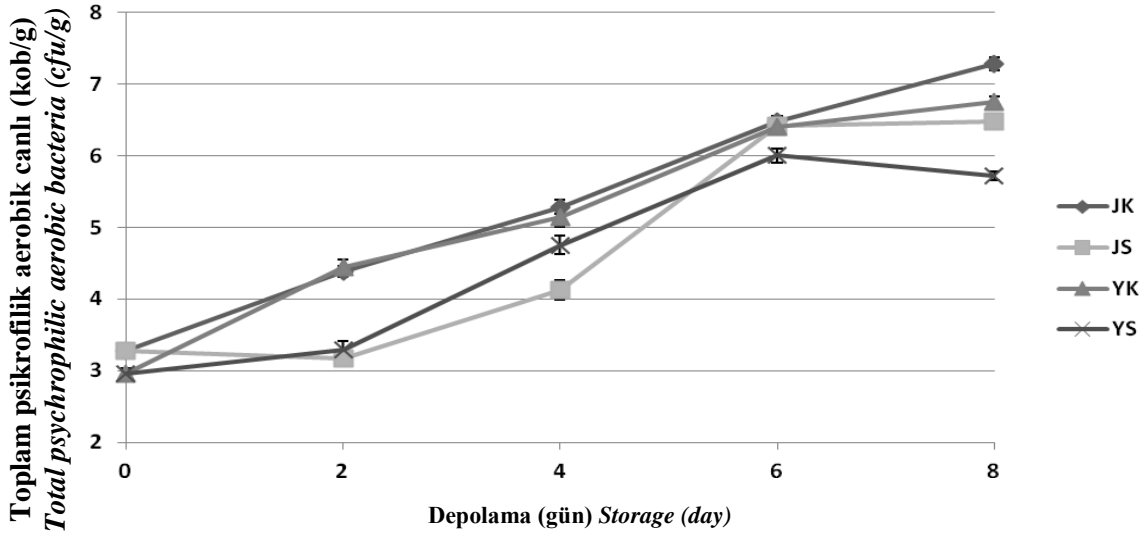
Depolama boyunca soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin toplam mezofilik aerobik canlı sayısında meydana gelen değişim Şekil 4'te verilmiştir. Depolama başında toplam canlı sayısı japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinde sırası ile 2.95 ve 2.68 log kob/g olarak belirlenmiştir. Tüm gruplarda artış gösteren toplam canlı sayısı depolama sonunda 4.74 ve 4.83 log kob/g olarak sırası ile japon karidesi ve yeşil kaplan karidesi kontrol gruplarında gözlenmiştir. Soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilen karideslerde toplam canlı sayısı kontrol gruplarından önemli derecede ($P < 0.05$) daha düşük bulunmuştur. En düşük bakteri sayısı ekstrakt ile muamele edilen

karideslerde gözlemlenmiş ve depolama sonunda japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinde sırası ile 4.57 ve 3.77 log kob/g olmuştur. Toplam psikrofilik canlı sayısı başlangıçta japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinde sırası ile 3.28 ve 2.95 log kob/g olarak tespit edilmiştir (Şekil 5). Psikrofilik canlı sayısı tüm gruplarda depolama boyunca artış göstermiş ve ekstrakt ile muamele edilen gruplarda daha düşük düzeyde ($P < 0.05$) tespit edilmiştir. Depolama sonunda toplam psikrofilik canlı sayısı ekstrakt uygulanan japon ve yeşil kaplan karidesinde sırası ile 6.48 ve 5.73 log kob/g olarak gözlenmiştir. Japon karidesi kontrol grubunda depolama sonunda toplam psikrofilik canlı sayısı 7.28 log kob/g değerine ulaşırken, yeşil kaplan karidesi kontrol grubu 6.27 log kob/g değerine ulaşmıştır.



Şekil 4. Japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin depolama süresince toplam mezofilik aerobik canlı sayısında meydana gelen değişimler.* JK: japon karidesi kontrol; JS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi; YK: yeşil kaplan karidesi kontrol; YS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş yeşil kaplan karidesi

Figure 4. Changes in total mesophilic aerobic bacteria number of japanese and green tiger shrimp during storage period.* JK: japanese shrimp control; JS: japanese shrimp treated with onion peel extract; YK: green tiger shrimp control; YS: green tiger shrimp treated with onion peel extract



Şekil 5. Japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin depolama süresince toplam psikrofilik canlı sayısında meydana gelen değişimler.* JK: japon karidesi kontrol; JS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi; YK: yeşil kaplan karidesi kontrol; YS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş yeşil kaplan karidesi

Figure 5. Changes in total psychrophilic bacteria number of japanese and green tiger shrimp during storage period.* JK: japanese shrimp control; JS: japanese shrimp treated with onion peel extract; YK: green tiger shrimp control; YS: green tiger shrimp treated with onion peel extract

Karideslerde kalitenin belirlenmesinde duyuşal ve kimyasal kalite analizlerinin yanında mikrobiyal değerlendirme de büyük önem taşımaktadır (Sivertsvik ve Birkeland, 2006). Zeng vd. (2005) soğukta depolanan karideslerde toplam canlı sayısını 2.4×10^5 kob/g olarak rapor etmişler ve depolama boyunca artış göstererek depolama sonunda (7. gün) 3×10^8 kob/g' a çıktığını bildirmişlerdir. Wang vd. (2018) karvakrol ilaveli kitosan bazlı yenilebilir filmlerle kapladıkları karidesleri buzda 10 gün süreyle depolamışlardır. Karideslerde toplam canlı sayısının depolama süresince artış gösterdiğini ancak kaplama yapılan karideslerde bu değerin kontrol grubundan önemli derecede düşük düzeyde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada Farajzadeh vd. (2016) jelatin ve kitosan bazlı yenilebilir filmlerle kapladıkları karideslerde toplam bakteri sayısını depolama başlangıcında 2.5 log kob/g olarak bulmuşlardır. Kontrol grubunda toplam canlı sayısının depolamanın 8. gününde limit değer olarak kabul edilen (ICMSF, 1986) 7 log kob/g'ı aştığı, kaplama yapılan gruplarda ise 14. günde bu değere ulaşıldığı görülmüştür. Aynı

çalışmada toplam psikrofilik canlı sayısının da kontrol grubunda kaplama yapılan gruplara göre daha yüksek düzeyde olduğu ve depolamanın 8. gününde kontrol ile diğer gruplar arasında toplam psikrofilik canlı sayısı bakımından yaklaşık 4.5 log kob/g fark olduğu tespit edilmiştir. Sae-leaw ve Benjakul (2019) farklı konsantrasyonlarda kaju yaprağı ekstraktı ile muamele ettikleri karideslerde 12 günlük depolama boyunca kalite değişimlerini gözlemlemişlerdir. Toplam canlı sayısı ve toplam psikrofilik canlı sayısının ekstrakt ile muamele edilen gruplarda kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan tüm çalışmalar karideslerde mikrobiyal kalitenin korunmasında doğal katkı maddelerinin etkili olduğunu ve mevcut çalışmada gözlenen sonuçları desteklediği görülmektedir.

Duyusal kalitede meydana gelen değişimler

Su ürünlerinin tazeliğinin ve kalitesinin belirlenmesinde duyuşal değerlendirme en güvenilir kriterlerden birisidir. Soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş taze karideslerin duyuşal özelliklerinde meydana gelen değişimler

Çizelge 1.'de verilmiştir. Kontrol grupları ve soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş karidesler arasında koku, tekstür, renk, görünüş ve genel beğeni özellikleri yönünden depolama boyunca istatistiksel olarak önemli düzeyde ($P < 0.05$) farklılıklar bulunmuştur. Depolama süresi ilerledikçe kontrol gruplarının duyuşal parametrelerinde düşüş olduğu gözlenmiş ve bu gruplar, soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş karides grupları ile kıyaslandığında depolama boyunca panelistlerden daha düşük puanlar almıştır. Her iki karides türünde de

kontrol grupları depolamanın 4. gününde duyuşal olarak reddedilmiş, ancak soğan kabuğu ekstraktı ilaveli gruplar depolama sonuna kadar kabul edilebilir özelliğini korumuştur. Aşık (2009) sarımsak yağı içeren kitozan bazlı kaplamalarla kaplanan karideslerin duyuşal değerlendirmesinde benzer sonuçlar elde etmiştir. Bu çalışmadan elde edilen duyuşal veriler doğrultusunda, soğan kabuğu ekstraktının japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinde raf ömrünün uzatılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 1. Japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinin depolama süresince duyuşal özelliklerinde meydana gelen değişimler.* JK: japon karidesi kontrol; JS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş japon karidesi; YK: yeşil kaplan karidesi kontrol; YS: soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş yeşil kaplan karidesi

Table 1. Changes in sensory properties of japanese and green tiger shrimp during storage period.* JK: japanese shrimp control; JS: japanese shrimp treated with onion peel extract; YK: green tiger shrimp control; YS: green tiger shrimp treated with onion peel extract

	JK	JS	YK	YS	Depolama (gün) Storage (days)
Koku (odor)	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	0
	5.80±0.75 ^{Bb}	7.60±0.49 ^{Abc}	6.00±0.63 ^{Bb}	8.20±0.40 ^{Ab}	2
	2.25±0.43 ^{Cc}	8.00±0.00 ^{Ab}	2.75±0.83 ^{Cc}	6.75±0.43 ^{Bc}	4
	1.50±0.50 ^{Bd}	7.25±0.43 ^{Ac}	1.00±0.00 ^{Bd}	6.75±0.43 ^{Ac}	6
	1.00±0.00 ^{Cd}	3.25±0.43 ^{Bd}	1.00±0.00 ^{Cd}	4.25±0.43 ^{Ad}	8
Tekstür (texture)	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	0
	4.60±0.80 ^{Bbc}	7.20±0.40 ^{Abc}	5.60±0.49 ^{Bb}	8.00±0.89 ^{Ab}	2
	5.50±1.50 ^{Bb}	7.50±0.50 ^{Ab}	3.25±0.43 ^{Cc}	6.50±0.50 ^{Abc}	4
	3.25±0.83 ^{Bcd}	6.75±0.43 ^{Ac}	3.50±0.50 ^{Bc}	7.00±0.00 ^{Ac}	6
	2.25±0.83 ^{Bd}	4.50±0.50 ^{Ad}	2.50±0.50 ^{Bd}	4.25±0.43 ^{Ad}	8
Renk (color)	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	0
	5.40±0.49 ^{Bb}	7.40±0.49 ^{Abc}	5.20±0.40 ^{Bb}	7.40±0.49 ^{Ab}	2
	5.25±1.30 ^{Bb}	7.75±0.43 ^{Ab}	3.25±0.43 ^{Cc}	6.50±0.50 ^{Abc}	4
	3.25±0.43 ^{Dc}	6.75±0.43 ^{Bc}	4.00±0.00 ^{Cc}	7.50±0.50 ^{Ab}	6
	1.50±0.50 ^{Bd}	5.00±1.00 ^{Ad}	3.00±1.22 ^{Bc}	5.00±0.71 ^{Ad}	8
Görünüş (appearance)	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	0
	5.40±0.49 ^{Bb}	7.60±0.49 ^{Ab}	5.20±0.40 ^{Bb}	8.20±0.75 ^{Ab}	2
	4.25±0.43 ^{Bc}	7.25±0.43 ^{Ab}	4.50±0.50 ^{Bbc}	7.50±0.50 ^{Abc}	4
	3.25±0.43 ^{Bd}	6.25±0.43 ^{Ac}	3.75±0.83 ^{Bcd}	6.75±0.43 ^{Ac}	6
	1.00±0.00 ^{Ce}	4.75±0.43 ^{Ad}	2.50±1.12 ^{Bd}	5.25±0.43 ^{Ad}	8
Genel beğeni (general acceptance)	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	9.00±0.00 ^{Aa}	0
	5.00±0.89 ^{Bb}	7.40±0.49 ^{Abc}	5.60±0.49 ^{Bb}	7.80±0.40 ^{Ab}	2
	3.75±0.83 ^{Bc}	7.75±0.43 ^{Ab}	3.00±1.22 ^{Bd}	6.25±0.83 ^{Ac}	4
	2.75±0.43 ^{Cd}	7.00±0.00 ^{Ac}	4.00±0.00 ^{Bc}	7.00±0.71 ^{Abc}	6
	1.25±0.43 ^{Ce}	4.50±0.50 ^{Ad}	2.50±0.50 ^{Bd}	5.25±0.43 ^{Ad}	8

Aynı satırlar arasındaki istatistiksel fark ($P < 0.05$) büyük harflerle, aynı sütunlar arasındaki istatistiksel fark ($P < 0.05$) küçük harflerle gösterilmiştir.

Means indicated by different capital letters in the same row differ significantly ($P < 0.05$). Means indicated by different lowercase letters in the same column differ significantly ($P < 0.05$).

SONUÇ

Karidesler bozulmaya karşı son derece hassas su ürünleridir. Bu nedenle son zamanlarda raf ömürlerinin arttırılması ve kalitelerinin korunmasına yönelik arayışlar da gittikçe önem kazanmaktadır. Bu çalışma bulgularına dayanarak, bir gıda atığı olan ve güçlü antioksidan ve antimikrobiyal özelliğe sahip soğan kabuğunun karideslerde kalitenin korunmasında etkili bir doğal materyal olabileceği söylenebilir. 8 günlük depolama süresince soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilen japon karidesi ve yeşil kaplan karidesinde hem fiziko-kimyasal parametreler bakımından hem de mikrobiyal kalite açısından daha düşük değerler elde edilmiştir. Ayrıca duyuşal olarak soğan kabuğu ekstraktı uygulanan karideslerin 8. güne kadar kabul edilebilir olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

Alparslan, Y., Hasanhoçaoğlu Yapıcı, H., Metin, C., Baygar, T., Günlü, A., Baygar, T. (2016). Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatin. *LWT-Food Sci Technol*, 72: 457-466.

Amerina, M.A., Pangborn, R.V., Roessler, E.B. (1965). Principles of sensory evaluation of food. New York: Academic Press, p. 602.

Arancibia, M.Y., Lopez-Caballero, M.E., Gomez-Guillen, M.C., Montero, P. (2015). Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. *Food Control*, 54: 259-266.

Aşık, E., Candoğan, K. (2014). Effects of chitosan coatings incorporated with garlic oil on quality characteristics of shrimp. *J Food Quality*, 37: 237-246.

Aşık, E. (2009). Sarımsak Yağı İçeren Kitozan Kaplamalarının Karideslerin Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

Bayizit, A.A., Yılsay, T.Ö., Yücel, A. (2003). Donmuş karideslerin bazı fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 20: 303-312.

Bilgin, S., Erdem, M.E., Duyar, H.A. (2006). Pişmiş ve çiğ olarak buzdolabı sıcaklığında

muhafaza edilen kahverengi karides' in, *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758), kimyasal kalite değişimleri. *Fırat Üniv Fen ve Müh Bil Der*, 18 (2): 171-179.

Cadun, A., Çaklı, Ş., Kışla, D. (2005). A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chem*, 90: 53-59.

Chinese National Standard (GB2741-94). (1994). Hygienic standard for sea shrimp. Beijing: Chinese National Hygiene Ministry.

Cook N.C., Samman S. (1996). Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*, 7(2): 66-76.

Çolakoğlu, F.A., Ormancı, H.B., Altın, A. (2006). Frische-Star ile Muamele Edilmiş Taze Karideslerin (*Parapenaeus longirostris*) Raf Ömrünün Saptanması Üzerine Bir Araştırma. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23(1/3): 383-386.

Farajzadeh, F., Motamedzadegan, A., Shahidi, S.A., Hamzeh, S. (2016). The effect of chitosan-gelatin coating on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under refrigerated condition. *Food Control*, 67: 163-170.

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

Hocaoglu, A., Demirci, A.S., Gumus, T., Demirci, M. (2012). Effects of gamma irradiation on chemical, microbial quality and shelf life of shrimp. *Radiat Phy Chem*, 81: 1923-1929.

HUSS, H.H. (1988). Fresh Fish: Quality and Quality Changes. Rome: Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, 132p.

Ifesan, B.O.T. (2017). Chemical Composition of Onion Peel (*Allium cepa*) and its Ability to Serve as a Preservative in Cooked Beef. *Int J Soc Res Methodol*, 7(4): 24-35.

(ICMSF) International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986). Sampling plans for fish and shellfish: microorganisms in foods 2, sampling for microbiological analysis: principles and scientific

- applications (2nd Ed) Toronto, Canada: University of Toronto Press, pp: 181-196.
- Kalıştır, S. (2008). Marine Edilmiş Çimçim Karidesi (*Metapenaeus stebbingi*)'nin Buzdolabında (+4°C) Depolama Süresince Kimyasal ve Duyusal Kalitesindeki Değişimler. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kim, H.J., Jung, S., Yong, H.I., Bae, Y.S., Kang, S.N., Kim, I.S., Jo, C. (2014). Improvement of microbiological safety and sensorial quality of pork jerky by electron beam irradiation and by addition of onion peel extract and barbecue flavor. *Radiat Phys Chem*, 98: 22-28.
- Lang, K. (1979). Der fluchtige basentichstoff (TVB-N) bei im binnenland in der verkehrgebrachten frischen seefischen. *Arch Lebensmittelhygiene*, 30: 215-217.
- Maqsood, S., Benjakul, S. (2011). Retardation of haemoglobin-mediated lipid oxidation of Asian sea bass muscle by tannic acid during iced storage. *Food Chem*, 124: 1056-1062.
- Nile, S.H., Nile, A.S., Keum, Y.S., Sharma, K. (2017). Utilization of quercetin and quercetin glycosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food Chem*, 235: 119-126.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S. (2011). Inhibition of melanosis formation in Pacific white shrimp by the extract of lead (*Leucaena leucocephala*) seed. *Food Chem*, 128(2): 427-432.
- Nirmal, N.P., Benjakul, S. (2012). Effect of green tea extract in combination with ascorbic acid on the retardation of melanosis and quality changes of Pacific white shrimp during iced storage. *Food Bioprocess Tech*, 5(8): 2941-2951.
- Patr, B., Öksüztepe, G., Emir Çoban, Ö., Dikici, A. (2009). Dondurulmuş Karides Etinden Hazırlanan Krokotlerin Raf Ömrü. *F.Ü Sağlık Bilim Derg*, 23(1): 29-37.
- Sadok, S., Abdelmoulah, A. El Abed, A. (2004). Combined effect of sepia soaking and temperature on the shelf life of peeled shrimp *Penaeus kerathurus*. *Food Chem*, 88: 115-122.
- Sae-leaw, T., Benjakul, S. (2019). Prevention of quality loss and melanosis of Pacific white shrimp by cashew leaf extracts. *Food Control*, 95: 257-266.
- Salman, S. (1995). Omurgasız Hayvanlar Biyolojisi. 220s. Zirem Basımevi ve Bilgisayar Merkezi. Antakya
- Schormüller, J. (1968). Handbuch der Lebensmittel Chemie. Band III/2 Teil. Tierische Lebensmittel Eier, Fleisch. Berlin, Heidelberg, New York: But-termilch, pp. 1482-1537.
- Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Singh, D.P., Sarma, B.K., Singh, H.B. (2009). Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. *Food Chem Toxicol*, 47(6): 1161-1167.
- Sivertsvik, M., Birkeland, S. (2006). Effects of soluble gas stabilisation, modified atmosphere, gas to product volume ratio and storage on the microbiological and sensory characteristics of ready-to-eat shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Sci Tech Int*, 12(5): 445-454.
- Tabaraki, R., Heidarizadi, E., Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. *Sep Purif Technol*, 98: 16-23.
- Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T., Dugan, J.R.L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chemist's Soc*, 37:44-48.
- Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E., Vasiliadou, S. (1997). Effectiveness of a natural Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 205(2): 93-96.
- Varlık, C., Baygar, T., Özden, Ö., Erkan, N., Erkan, N.,Metin, S. (2000). Soğukta depolanan karideslerin (*Parapenaeus longirostris*, Lucas 1846) bazı duyusal, fiziksel ve kimyasal parametrelerinin belirlenmesi. *Turk J Vet Anim Sci*, 24: 181-185.

- Varlik, C. (1993). Su ürünlerinde kalite kontrol ilke ve yöntemleri. *Gıda Teknolojisi Derneği*, 17: 16-17.
- Viera, V.B., Piovesan, N., Rodrigues, J.B., Mello, R. de O., Prestes, R.C., Santos, R.C. V dos., Vaucher, R. de A., Hautrive, T.P., Kubota, E.H. (2017). Extraction of phenolic compounds and evaluation of the antioxidant and antimicrobial capacity of red onion skin (*Allium cepa* L.). *Int Food Res J*, 24(3): 990-999.
- Wang, Q., Lei, J., Ma, J., Yuan, G., Sun., H. (2018). Effect of chitosan-carvacrol coating on the quality of Pacific whiteshrimp during iced storage as affected by caprylic acid. *Int J Biol Macromol*, 106: 123-129.
- Wenjiao, F., Yongkui, Z., Pan, D., Yuwen, Y. (2013). Effects of chitosan coating containing antioxidant of bamboo leaves on qualitative properties and shelf life of silver carp during chilled storage. *Czech J Food Sci*, 31(5): 451-456.
- Zeng, Q.Z., Thorarinsdottir, K.A., Olafsdottir, G. (2005). Quality changes of shrimp (*Pandalus borealis*) stored under different cooling conditions. *J Food Sci*, 70(7): 459-466.

PROBİYOTİK BİTTER ÇİKOLATA ÜRETİMİNDE MİKROENKAPSÜLE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* KULLANIMI

Zerrin Erginkaya¹, Ezgi Sarıdokal¹, Serya Tülin Özkütük¹,
Gözde Konuray¹, Emel Ünal Turhan^{2*}

¹ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Adana, Türkiye

² Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü,
Kadirli-Osmaniye, Türkiye

Geliş / Received: 12.01.2019; Kabul / Accepted: 03.03.2019; Online baskı / Published online: 10.03.2019

Erginkaya, Z., Sarıdokal, E., Özkütük, S.T., Konuray, G., Ünal-Turhan, E. (2019). Probiyotik bitter çikolata üretiminde mikroenkapsüle *Lactobacillus rhamnosus* kullanımı. *GIDA* (2019) 44 (2): 238-247 doi: 10.15237/gida.GD18050

Erginkaya, Z., Sarıdokal, E., Özkütük, S.T., Konuray, G., Ünal-Turhan, E. (2019). The use of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in probiotic bitter chocolate production. *GIDA* (2019) 44 (2): 238-247 doi: 10.15237/gida.GD18050

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, probiyotik bitter çikolata üretiminde mikroenkapsüle *Lactobacillus rhamnosus* kullanımının farklı sıcaklıklardaki depolama süresince canlı probiyotik hücre sayısı ve duyu özellikleri üzerindeki etkisini araştırmaktır. Çalışmada probiyotik çikolata üretiminde kullanılan *L. rhamnosus* ekstrüzyon tekniği ile mikroenkapsüle edilmiş ve probiyotik çikolatalar 2 farklı sıcaklıkta (4°C ve 25°C) 60 gün boyunca depolanmıştır. Mikroenkapsülasyon işlemi çikolatanın erime sıcaklıklarında probiyotik kültürler dayanım kazandırmıştır. 4°C'de depolamanın canlı hücre sayısını koruma yönünden daha elverişli olduğu tespit edilirken, 25°C'de depolama sonucunda çikolatalardaki probiyotik hücre sayısında ciddi düzeyde düşüş gözlemlenmiştir. Sonuç olarak bitter çikolata üretiminde mikroenkapsülasyon işlemi ve 4°C'de buzdolabı koşullarında depolama probiyotik hücre dayanımını arttırdığı için önerilmiştir.

Anahtar kelimeler: Çikolata, probiyotik, mikroenkapsülasyon, *L. rhamnosus*

THE USE OF MICROENCAPSULATED *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* IN PROBIOTIC BITTER CHOCOLATE PRODUCTION

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of the use of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in the production of probiotic bitter chocolate on probiotic viable cell count and sensory properties during storage at different temperatures. *L. rhamnosus* used in the production of probiotic chocolate was microencapsulated by extrusion technique and probiotic chocolate was stored at two different temperature (4°C and 25°C) throughout 60 days. The microencapsulation provided resistance to probiotic cultures at chocolate melting temperatures. While storage at 4°C was found more convenient to protect the survival of probiotic cells, storage at 25°C caused a serious decline in probiotic viability of tested microorganism in chocolates. As a result, microencapsulation technique and storage under refrigerator conditions (at 4°C) has been suggested to ensure the stability of probiotic cells in bitter chocolate production.

Keywords: Chocolate, probiotic, microencapsulation, *L. rhamnosus*

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ emelunalurhan@gmail.com,

☎ (+90) 328 888 0090

☎ (+90) 328 888 0091

GİRİŞ

Dünya çapında çoğunluğunu probiyotik gıdaların oluşturduğu fonksiyonel ürünlerin tüketimine yönelik bir eğilim söz konusudur ve bu durum gün geçtikçe artmaktadır. Probiyotikler, yeterli miktarlarda alındıklarında insan sağlığı üzerinde yararlı etkileri olan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır (FAO/WHO, 2003). Gıdalarda yaygın olarak kullanılan probiyotik bakteriler *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* cinslerine ait türlerdir. Bunlardan *L. rhamnosus* ise en sık başvurulan probiyotik bakteri türüdür ve “GRAS” yani tüketimi genellikle güvenli olarak tanımlanmıştır. Bu probiyotik bakterinin sağlık üzerinde bağışıklık sistemini güçlendirme, gastrointestinal enfeksiyonları, diareyi ve gıda kaynaklı bazı alerjileri önleme gibi faydaları vardır (Randazzo vd., 2013; Segers and Lebeer, 2014). Probiyotiklerin sağlığa yararlı etkilerinin görülebilmesi için gıdalarda 10^6 - 10^7 KOB/g veya mL düzeyinde bulunması ve tüketimden sonra gastrointestinal sistemde canlılıklarını devam ettirmesi gerekir (Akan ve Kınık, 2015; Toldam vd., 2016). Bağırsak mikrobiyotasındaki yararlı mikroorganizmaların sayısını arttırmada probiyotik gıda tüketiminin yanı sıra uygulanan diğer bir yaklaşımda prebiyotik maddelerin kullanımıdır. Prebiyotikler, konakçının gastrointestinal kanalında probiyotiklerin gelişimini destekleyen sindirilemeyen gıda maddeleridir (Alegro vd., 2007). Probiyotikler çoğunlukla süt ve süt ürünlerinde kullanılmış ancak son yıllarda fermente sosis, sucuk, meyve suyu, tahıl gevrekleri, çikolata, puding, bebek maması ve mayonez gibi ürünlerde de kullanım potansiyellerinin olduğu bildirilmiş ve dünya çapında yeni probiyotik gıdaların geliştirilmesine önem verilmiştir (Capela vd., 2006; Ceyhan vd., 2012; Fahimdanesh vd., 2012; Anekella vd., 2013; Champagne vd., 2015; Kalkan vd., 2018). Probiyotik gıda ürünleri geliştirilirken probiyotik mikroorganizmanın gıdanın bileşim, üretim ve depolama koşulları gibi stres faktörlerine dayanıklı olması hedeflenmektedir. Probiyotik gıda ürünlerinin geliştirilmesini sınırlayan bu stres faktörlerinin üstesinden gelmek için mikroenkapsülasyon gibi yeni teknolojilere başvurulmuştur (Possemiers vd., 2010). Mikroenkapsülasyon işleminin olumsuz çevre

koşullarına karşı probiyotik bakterilerin canlılığını korumada etkili olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur (Champagne vd., 2015; Heidebach vd., 2012; Raymond vd., 2015). Mikroenkapsülasyon; katı, sıvı veya gaz halindeki maddelerin kapsül olarak adlandırılan inert bir kabuğun içinde hapsedilerek kontrollü salınımının gerçekleştirildiği bir teknolojidir (Ünal ve Erginkaya, 2010). Probiyotik gıdalarda kullanılan kültürlerin mikroenkapsülasyonunda daha çok ekstrüzyon yönteminden yararlanılmakta ve kaplama materyali olarak aljinat, gellan gum ve jelatin kullanılmaktadır (Malmo vd., 2013). Ancak son yıllarda, probiyotik ve prebiyotikler arasındaki sinerjik etkiler nedeniyle kaplama materyallerine çeşitli prebiyotik katkıların (fruktooligosakkarit, inülin, dirençli nişasta, peptit vb) ilavesi de tercih edilmeye başlanmıştır (Capela vd., 2006; Hernandez vd., 2012; Zanjani vd., 2012).

Gıda endüstrisi; rekabet ortamı içinde sürekli yeni fonksiyonel probiyotik gıdalar geliştirmekte ve pazarda ön plana çıkmaya çalışmaktadır (Kemsawasd vd., 2016). Son yıllarda şekerleme endüstrisinde özellikle de çikolata ve türevi ürünlerde probiyotik kültürlerin potansiyeli üzerinde durulmuş ve uluslararası pazarda Kanada, Belçika, Amerika ve Malezya gibi ülkelerde probiyotik bitter çikolatalar satışa sunulmuştur (Foong vd., 2015; Konar vd., 2016; Güneş vd., 2018). Çikolata, şekerleme ürünleri arasında biyoyararlılığının da bir sonucu olarak çok fazla talep edilen ve yüksek oranda tüketilen bir üründür. Araştırmalar göstermiştir ki çikolata sadece yağ ve şekerin basit bir karışımı değil aynı zamanda epikateşin, kateşin ve prosiyanidin gibi polifenoller ve flavanoidleri içeren bileşimlerinden dolayı biyoaktif özellikleri olan fonksiyonel bir gıda maddesidir ve bu gıda maddesine probiyotik kültür ilavesinin ürünün cezbediciliğini daha da arttıracığı düşünülmektedir (Kemsawasd vd., 2016; Succi vd., 2017). Çikolata; potasyum, magnezyum, bakır ve demir gibi mineral maddelerce de zengindir. Kakaodaki biyoaktif fenolik bileşiklerin yaşlanma karşıtı, oksidatif stresleri düzeltme, kan basıncını düzenleme, antikanserojen, kalp hastalığı ve krizi riskini azaltma gibi sağlık üzerindeki olumlu etkileri, çikolata ve türevi ürünler üzerindeki ilgiyi

arttırmıştır (Possemiers vd., 2010; Mandal vd., 2013; Erdem vd., 2014; Gadhiye vd., 2015). Probiyotiklerin çikolatalara endüstriyel ölçekte ilave edilmesinde ürünün kendi bileşiminden (yüksek şeker içeriği, düşük su aktivitesi, fenolik maddeler vb) ve üretimden (sıcaklık, basınç, depolama vb.) kaynaklanan zorluklarla karşılaşılabilir (Gadhiya vd., 2015). Bitter çikolatalarda mikroenkapsüle probiyotik kültür kullanımının bu zorlukların üstesinden geleceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, mikroenkapsüle *L. rhamnosus* kullanılarak probiyotik bitter çikolata üretimi gerçekleştirilmiş ve depolama koşullarının probiyotik hücre canlılığı ve duyuşal özellikler üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada kullanılan bitter çikolata Tören Gıda San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir. Çikolatalarda probiyotik kültür olarak *Lactobacillus rhamnosus* (RIUM/ Hollanda) kullanılmıştır. Stok kültürden alınan *L. rhamnosus* MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) broth (Merck, Germany) besiyeri içerisinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak geliştirilmiş ve diğer işlemler için kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Yöntem

Bu çalışmada mikroenkapsüle ve serbest probiyotik kültür içeren bitter çikolata üretimi (2 paralel ve 3 tekrür) 3 farklı deneme planı ile gerçekleştirilmiştir. Deneme planında mikroenkapsülasyonda kullanılacak kaplama materyalleri kombinasyonunun kurulmasında daha önceki çalışma sonuçlarından elde edilen verilerden yararlanılmıştır. Önceki çalışmalarda, probiyotiklerin sıcaklık dayanımları açısından %3 aljinat ve %1 jelatin'den oluşan kaplama materyalleri ve gastrik koşullara dayanımları açısından ise %3 fruktooligosakkarit (FOS) ve %1 peptit gibi probiyotik katkı ilaveli kaplama materyalleri kullanımı önerilmiştir (Chen vd., 2006; Turhan vd., 2014). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda probiyotik katkılı (%3 aljinat + %1 jelatin + %3 fruktooligosakkarit + %1 peptit) ve probiyotik katkısız (%3 aljinat + %1 jelatin) olmak

üzere iki farklı kaplama materyali ile mikroenkapsülasyon işlemi hedeflenmiştir.

Üretilen çikolatalar 2 farklı sıcaklıkta (4°C ve 25°C) depolanmıştır. Çikolatalarda üretimin hemen ardından 0. gün, 30. gün ve 60. gün olmak üzere 3 farklı aşamada örnekler alınıp *L. rhamnosus* sayımı ve duyuşal analizler gerçekleştirilmiştir.

Probiyotik Kültürlerin Ekstrüzyon Tekniğı ile Mikroenkapsülasyonu

L. rhamnosus'un mikroenkapsülasyonunda ekstrüzyon tekniğinden yararlanılmıştır (Chen vd., 2007). Kullanılan tüm cam malzemeler ve çözeltiler 121°C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Kaplama materyali çözeltisi destile su kullanılarak hazırlanmıştır. Çikolatalarda kullanılmak üzere probiyotik kültürü içeren süspansiyon (10⁹ KOB/mL) steril kaplama materyali çözeltisine 1/5 oranında ilave edilmiştir. Probiyotik kültür içeren bu karışım (10⁸ KOB/mL) 0.11 mm'lik iğnesi olan şırınga ile 0.05 M'lık steril CaCl₂ (Merck-Germany) çözeltisi içerisine enjekte edilmiştir. Oluşan kapsüller, yeterli sertliğı kazanmaları amacıyla 30 dakika süre ile çözelti içerisinde bırakılmış ve sonra "whatman# 4 filtre kâğıdı" (Merck) ile süzülerek kullanıma hazır hale gelmiştir.

Probiyotik Bitter Çikolata Üretim Aşamaları

Probiyotik bitter çikolatalar 3 tekerrürlü olarak üretilmiştir. Üretim ile ilgili deneme planı Çizelge 1'de gösterilmiştir.

Probiyotik çikolata üretimi için ambalaj olarak alüminyum folyodan elde edilen kaplar otoklavda steril edilmiştir. Aseptik koşullar altında steril alüminyum folyo kapların içerisine probiyotik kültür ilave edildikten sonra (10⁸ KOB/g veya mL) üzerine su banyosunda (50°C sıcaklıkta) erimekte olan çikolatadan yaklaşık 10 gram ilave edilerek karıştırılmış ve soğumaları için bir müddet oda sıcaklığında bekletilerek yeterli sertliğe ulaşmaları sağlanmıştır. Ardından çikolata ambalajları kapatılarak 4°C'de buzdolabında ve 25°C'de inkübatörde depolamaya bırakılmıştır (Gadhiya vd., 2015).

Çizelge 1. Probiyotik çikolata üretimi deneme planı
Table 1. Trial Plan on Probiotic Chocolate Production

Çikolata <i>Chocolate</i>	Üretim Yöntemi <i>Production Method</i>
A	Serbest probiyotik kültür içeren çikolata <i>Chocolate with free probiotic culture</i>
B	Mikroenkapsüle (%3 aljinat + %1 jelatin) probiyotik kültür içeren çikolata <i>Chocolate with microencapsulated (3% alginate + 1% gelatine) probiotic culture</i>
C	Prebiyotik katkı ilaveli mikroenkapsüle (%1 peptit + %3 FOS + %3 aljinat + %1 jelatin) probiyotik kültür içeren çikolata <i>Chocolate with prebiotic ingredient-adding microencapsulated (1% peptide + 3% FOS + 3% alginate + 1% gelatine) probiotic culture</i>

Probiyotik Çikolatalardaki *L. rhamnosus* Sayısının Belirlenmesi

L. rhamnosus sayımı için, 10 g çikolata 90 mL steril dilüsyon sıvısı ile (%0.85 tuz ve %0.1 pepton içeren) 2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekten 1 mL alınmış ve dilüsyon sıvısı kullanılarak seyreltilmiştir. Daha sonra 0.1 mL seyreltilmiş örnekler de Man, Rogosa Sharpe (MRS) agar'a (Merck-Germany) yayma ekim yöntemiyle ekilmiş ve 37°C'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Halkman, 2005).

Probiyotik Çikolatalarda Duyusal Analiz

Probiyotik çikolatalarda duyusal analizler 5 kişiden oluşan panelist tarafından gerçekleştirilmiştir. 3 ayrı çikolata örneği daha önceki araştırmacılar tarafından önerilen duyusal özelliklere göre 1-9 puan üzerinden değerlendirilmiştir (Erdem vd., 2014; Toldam vd., 2016; Zaric vd., 2016; Succi vd., 2017). Analizlerde kullanılan form Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Probiyotik çikolatalarda duyusal analiz değerlendirme formu
Table 2. The evaluation form for sensorial properties of probiotic chocolate

Duyusal Özellikler <i>Sensory Properties</i>	Tanım <i>Definition</i>	Puan* <i>Point</i>
Görünüş <i>Appearance</i>	-Pürüzsüzlük: Ürün yüzeyinde kum parçacıkları olmaksızın pürüzsüz yüzey <i>Smoothness: Smooth appearance of products surface without lumps of grits</i>	
	-Parlaklık: Ürün yüzeyindeki ışık yansımalarının yoğunluğu (opak görüntünün zıttı) <i>Brightness: Intensity of light reflection in the product, opposite of opaque</i>	
	-Çiçeklenme: Yüzeydeki görünür lipid/şeker kristallerinin beyaz-gri tabakası <i>Bloom: White-gray layer of visible lipid/sugar crystals on the surface</i>	
Aroma <i>Flavour</i>	-Kakao aroması: Kakao tozu aroması (azdan çoğa) <i>Cocoa aroma: The aroma of cocoa powder (from none > very)</i>	
	Off-flavour: İstenmeyen hoş gitmeyen aroma <i>Off-flavor: Unpleasant and unwanted aroma in the product</i>	
Tat <i>Taste</i>	-Kakao tadı: Üründeki kakao tadının yoğunluğu <i>Cocoa taste: The intensity of the taste of cocoa in the product</i>	
	-Tatlılık: Çoğunlukla sükrözle ilişkilendirilen tat kalitesi (azdan çoğa) <i>Sweetness: Taste quality most often associated with sucrose (none > very)</i>	

Çizelge 2. devam

Tekstür (İlk ısırıktaki) <i>Texture (first bite)</i>	-Sertlik: Merkezi kesici dişleri kullanarak kesmek için gereken kuvvet <i>Hardness: The force required to cut using central incisor teeth</i> -Kırılabilirlik: İlk ısırıktaki çikolata parçasının kırılma düzeyi <i>Breakage: The breakage level of the piece of chocolate in first bite</i> -Dayanıklılık: Dil ve damak arasındaki örneği sıkıştırmak için gerekli kuvvet <i>Firmness: Force required to compress sample between tongue and palate</i>
Tekstür (Çiğneme) <i>Texture (Chewing)</i>	-Pürüzsüzlük: Ürünün ağızda eşit ve tutarlı düzeyde sürekli dağılımı <i>Smoothness: Level of even and consistent continuity of the product in mouth</i> -Erime düzeyi: Çiğneme esnasında örneğin yarısının erimesi için istenen süre (yavaştan hızlıya) <i>Melting rate: Time required to melt half of the sample while chewing (slow > fast)</i> -Yapışkanlık: Azı dişine yapışma düzeyi <i>Adherence: Level of stickiness to molar teeth</i> -Yayılmaya: Ağız yüzeyini kaplama düzeyi <i>Spreadiness: Level of covering the surface of the mouth</i> -Ağız kaplama: Ağız yüzeyini kaplayan film hissi <i>Mouth coating: The after-feel film which covers mouth surface</i>
Renk <i>Colour</i>	-Kahverengi renk: Açık kahveden koyu kahveye renk <i>Brown colour: Light brown to dark brown</i>
Genel kabul edilebilirlik <i>Overall Acceptability</i>	-Genel anlamda ürünün kabul edilebilirliği <i>Acceptability of the product in general with all its sensory properties</i>

Puan* (1-9): 9=oldukça iyi, 5=ne iyi ne kötü, 1=oldukça kötü

Point* (1-9): 9=extremely like, 5= neither like nor dislike, 1= extremely dislike

İstatistiksel Analizler

Elde edilen bulgular SPSS 20 paket programı (IBM SPSS Advanced Statistics 20.0-SPSS Inc, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve önemli bulunan farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre ($P<0.05$) değerlendirilmiştir (Düzgüneş vd., 1987; Özdamar, 1999).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Gıda matrisi, proses koşulları, depolama koşulları ve gastrointestinal sistem gibi faktörler probiyotik mikroorganizmaların canlılıklarını sınırlandıran faktörler olarak bilinir. Mikroenkapsülasyon bu bahsedilen faktörlere karşı probiyotik hücreyi korumada en etkili olan yöntemlerden biri olarak

görülmektedir (Gadhiya vd., 2015). Bitter çikolatalar sade çikolatalar ile kıyaslandığında yaklaşık 5 kat daha fazla polifenol içeriğine sahiptir ve fenolik maddelerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı yararlı ürünlere eğilim gösteren tüketiciler tarafından tercih edilirler. Ancak bu gibi ürünlerde yüksek fenolik madde içeriği probiyotik kültürler üzerinde antimikrobiyel etkiye neden olabilir ve bitter çikolatalarda probiyotik kültürlerin uygulanması zorlaşabilir (Foong vd., 2015). Bu bakımdan bitter çikolata gibi bileşim yönünden probiyotik kültürlerin canlılığını olumsuz etkileyecek ürünlerde mikroenkapsülasyon yöntemine başvurmak faydalı olabilir (Possemiers vd., 2010). Bu çalışmada bitter çikolatalarda mikroenkapsüle

probiyotik kültür kullanımının hücre canlılığı ve duyuşal özellikler üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

Depolama süresince probiyotik bitter çikolata örneklerindeki canlı *L. rhamnosus* sayısındaki değişim Çizelge 3'de gösterilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere depolama süresinin ve sıcaklığının canlı hücre konsantrasyonu üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). 4°C'de buzdolabı koşullarında depolama sırasında 30. günde çikolata örneklerindeki probiyotik hücre sayısında artış gözlenirken, 60. günde ise azalış gözlenmiştir. 25°C'de depolamanın ise hücre konsantrasyonu üzerinde ciddi bir düşüőe neden olduğu görülmüştür. Nitekim, 4°C'deki depolama koşullarının probiyotiklerin canlılıklarını koruması açısından daha elverişli olduğu saptanmıştır. 4°C'de depolama koşullarında probiyotik kültürlerin mikroenkapsülasyonunda kullanılan kaplama materyallerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi 0. ve 30. günlerde istatistiksel olarak önemli bulunurken 60. günde örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın bulunmadığı belirlenmiştir ($P<0.05$). 25°C'deki koşullarda kaplama materyallerinin etkisi ise hücre canlılığında ciddi bir düşüş gözleendiği için göz ardı edilmiş ve değerlendirmeye alınmaması uygun bulunmuştur. Probiyotik gıdalarda bulunan probiyotik kültürlerin sağlık üzerinde beklenen olumlu etkilerini gösterebilmeleri için canlılıklarını (en az 10^7 KOB/g veya mL düzeyinde) korumaları gerekmektedir. Bu çalışmada 25°C'de depolama koşulları hücre canlılığını olumsuz etkilemiştir. Laktik asit bakterileri 27-30°C gibi mezofilik sıcaklık değerlerinde metabolik aktivitelerine devam edip çeşitli metabolitler üretebilirler. Metabolik aktivitesini devam ettiren mikroorganizma bir süre sonra mikrobiyel gelişme fazlarından ölüm fazına geçip canlılığını önemli düzeyde kaybedebilir. Bu bilgiler ışığında probiyotik gıdaların metabolik aktivitenin görülmeyeceği ya da en az düzeyde görüleceği sıcaklıklarda depolanmasının daha uygun olduğu bildirilmiştir (Dharmasena 2012; Khanafari vd., 2012). Bu bakımdan çalışmamızda 4°C'de depolama koşullarında ise 60. günün sonunda A ve B örneklerindeki probiyotik hücre konsantrasyonunda yaklaşık 1 log KOB/g

düzeyinde, C örneğinde ise yaklaşık 2 log KOB/g düzeyinde düşüş gözlenmiştir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, probiyotik çikolata üretimi ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda özellikle 4°C ve 25°C'de depolama karşılaştırıldığında oda sıcaklığında depolamanın hücre sayısında ciddi bir azalışa neden olduğu bildirilmiştir. Nitekim 60 günlük bir depolama periyodu sonunda 4°C'de depolamanın probiyotik canlı hücre sayısında 1-2 log KOB/g düşüőe; 25°C'de depolamanın ise 4-7 log KOB/g düşüőe neden olduğu bildirilmiştir (Mandal vd., 2013; Foong vd., 2015; Kemsawasd vd., 2016). Çikolatalarda kullanılan probiyotik kültürlerin türüne, üretim koşullarına, depolama koşullarına ve çikolata çeşidine göre probiyotik canlı hücre sayısı değişebilmektedir (Khanafari vd., 2012). Çalışmamızda farklı probiyotik kültür ve mikroenkapsülasyon işlemleri uygulaması ile depolama dayanımları geliştirilmeye çalışılmış ancak literatüre benzer sonuçlar bulunmuştur. Bu durum probiyotik çikolatalarda depolama koşulu olarak 4°C'nin oda sıcaklığından daha elverişli olduğunu bir kez daha ortaya koymuştur. Ancak yine de çikolatalarda probiyotik kültürlerin canlılıklarını koruyabilecek 25°C'de depolamaya dirençli farklı probiyotik türler ve proses yöntemlerinin denenmesi önerilmektedir.

Sonuçlarımızdan da görüldüğü üzere mikroenkapsüle probiyotiklerin kullanıldığı çikolatada gerek farklı depolama sıcaklıklarında gerekse depolama sürelerinde canlı hücre sayısı serbest kültür kullanılandan yüksek bulunmuştur. Bu bulgu mikroenkapsülasyon işleminin sıcaklık ve gıda bileşiminden kaynaklanan stres faktörlerine karşı hücre dayanımını arttırdığı bilgisini desteklemiştir (Zanjani vd., 2012, Konar vd., 2016). Bu çalışmada dikkat çeken bir diğer nokta ise depolamanın başlangıcında (sıfırncı günde) serbest kültürlerin kullandığı çikolatada hücre sayısının daha düşük bulunmasıdır. Probiyotik çikolata üretimi sırasında çikolatalara ilave edilen kültür konsantrasyonunun her üç grup çikolatada da aynı olmasına rağmen, serbest kültürlerin ilave edildiği çikolatada daha düşük canlı hücre sayısının bulunması diğer grup çikolatalarda mikroenkapsülasyon işleminin hücreye çikolata eritme sıcaklıklarında direnç kazandırdığı hipotezini desteklemiştir (Ding ve

Shah, 2007). B ve C örneklerinde probiyotik kültürlerin mikroenkapsülasyon ile sıcaklık dayanımları artırılmış böylece yaklaşık 50°C'deki çikolata eritme sıcaklığına direnç gösterilmiştir. A örneğinde ise serbest kültürlerin doğrudan eritme sıcaklığındaki çikolata ile ve çikolatanın kendi bileşiminden kaynaklı stres faktörleri ile karışması sonucu bazı hücreler inaktive olmuş ve hücre sayısında azalma gözlenmiştir. Sonuçlarımızdan da görüldüğü üzere probiyotik katkı kullanımının probiyotik hücre canlılığı üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Benzer

olarak; Patel vd., (2008) probiyotik katkı (inülin) mikroenkapsüle *L. paracasei* ile çikolatalı sufle üretiminde kullanılan probiyotik katkının hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Bu sonuçlarla uyumlu olarak başka bir çalışmada çikolatalı mus (krema-köpük) üretiminde probiyotik kültür olarak *L. paracasei* ve probiyotik katkı olarak ise inülin kullanılmıştır. Kullanılan inülinin probiyotik canlılığı ve duyuşal özellikler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (Alegro vd., 2007).

Çizelge 3. Probiyotik bitter çikolata örneklerindeki canlı *L. rhamnosus* sayısı (log KOB/g)
Table 3. The viable cell count of *L. rhamnosus* in probiotic bitter chocolate samples

Örnek Sample	Depolama süresi Storage time			Depolama sıcaklığı Storage Temperature
	0. gün Zero day	30. gün 30 th day	60. gün 60 th day	
A	5.46±0.25 ^{aA}	6.28±0.06 ^{aB}	5.25±0.19 ^{aA}	4°C
	5.46±0.25 ^{aC}	3.66±0.09 ^{dA}	2.83±0.05 ^{eA}	25°C
B	6.13±0.24 ^{bB}	6.48±0.09 ^{aB}	5.64±0.01 ^{aA}	4°C
	6.13±0.24 ^{bB}	2.79±0.45 ^{dA}	1.01±1.42 ^{deA}	25°C
C	7.21±0.04 ^{cB}	7.35±0.25 ^{bB}	5.35±0.16 ^{aA}	4°C
	7.21±0.04 ^{cC}	3.29±0.13 ^{dB}	0.00 ±0.00 ^{dA}	25°C

a,b,c,d,e,f: Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır- Different lowercase letters denote significant differences on the same column ($P<0.05$)

A,B,C: Aynı satırda farklı üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır- Different capital letters denote significant differences on the same line ($P<0.05$)

Depolama süresince probiyotik bitter çikolata örneklerinin duyuşal özelliklerindeki değişim ise Çizelge 4'de gösterilmiştir. Sonuçlardan da görüldüğü üzere özelliklerde genel kabul edilebilirlik özellikleri dikkate alındığında örnekler arasında önemli bir farklılığın olmadığı görülmüştür ($P<0.05$). Bu durum mikroenkapsülasyon işleminin duyuşal özellikleri olumsuz etkilemediğini ortaya çıkarmıştır. Depolama sıcaklığının ve depolama süresinin farklı duyuşal özellikler üzerindeki etkisi ise değişkenlik göstermiştir. Bazı duyuşal özellikler üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli bulunurken bazıları üzerindeki etkisi ise önemsiz bulunmuştur. Bu nedenle duyuşal özellikler ve depolama koşullarının etkisi arasında tam bir

korelasyon kurulamamıştır. 4°C'deki depolama koşullarında çoğunlukla görünüş, aroma, tat, tekstür ve renk özellikleri açısından depolama süresinin etkisi A örneği için önemsiz diğerleri için (B ve C örnekleri) önemli bulunmuştur. Bu durum B ve C örneklerinde çikolatalara ilave edilen probiyotik kapsüllerin depolama süreci ile birlikte duyuşal özellikleri etkilediğini göstermiştir.

Önceki çalışmalarda elde edilen verilere göre mikroenkapsüle kültürlerin kullanıldığı çikolatalar duyuşal değerlendirmeler sonucunda serbest kültür kullanılarak üretilen çikolatalara benzer puanlar almıştır (Kemsawasd vd., 2016). Çikolata türevi ürünlerde mikroenkapsüle probiyotik kültür kullanımının yanı sıra probiyotik katkı

kullanımının da duyuşal özellikleri pek fazla etkilemediğı yapılan araştırmaların birçoğunda vurgulanmıştır (Patel vd., 2008; Mandal vd., 2013). Çalışmamızda örnekler duyuşal olarak

genellikle yakın puanlar almış ve sonuçlarımız literatür bilgilerini desteklemiştir.

Çizelge 4. Probiyotik bitter çikolata örneklerinin duyuşal analiz sonuçları
Table 4. The results of sensorial analysis of probiotic chocolate samples

Örnek Sample	Görünüş Appearance	Aroma Flavour	Tat Taste	Tekstür- ilk ısırıktaki Texture- first bite	Tekstür- çıgneme Texture- chewing	Renk Colour	Genel kabul edilebilirlik Overall acceptability
A0-4°C	8.00 ^{bc}	8.00 ^{bc}	7.60 ^{abc}	7.40 ^{abc}	7.40 ^{ab}	8.60 ^b	7.80 ^{ab}
A0-25°C	8.60 ^c	8.40 ^c	8.20 ^c	8.80 ^c	8.20 ^b	9.00 ^b	8.40 ^b
A30-4°C	8.20 ^{bc}	8.20 ^{bc}	8.00 ^{bc}	8.20 ^{abc}	8.00 ^b	7.00 ^{ab}	8.00 ^{ab}
A30-25°C	6.20 ^{ab}	7.20 ^{abc}	6.80 ^{abc}	7.60 ^{abc}	6.60 ^{ab}	7.60 ^{ab}	6.80 ^{ab}
A60-4°C	6.80 ^{bc}	7.00 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.40 ^{abc}	7.00 ^{ab}	7.20 ^{ab}	8.00 ^{ab}
A60-25°C	7.20 ^{bc}	7.20 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.40 ^{ab}	8.10 ^{ab}	7.20 ^{ab}
B0-4°C	6.60 ^{abc}	8.40 ^c	8.20 ^c	7.80 ^{abc}	7.40 ^{ab}	8.20 ^b	8.20 ^{ab}
B0-25°C	8.00 ^{bc}	7.60 ^{abc}	7.40 ^{abc}	8.60 ^{bc}	7.00 ^{ab}	8.80 ^b	8.00 ^{ab}
B30-4°C	7.20 ^{bc}	8.00 ^{bc}	7.60 ^{abc}	7.20 ^{abc}	7.60 ^b	7.60 ^{ab}	7.60 ^{ab}
B30-25°C	6.60 ^{abc}	7.20 ^{abc}	6.60 ^{abc}	6.80 ^{abc}	6.40 ^{ab}	7.40 ^{ab}	7.20 ^{ab}
B60-4°C	4.40 ^a	5.30 ^a	5.50 ^a	5.80 ^a	5.00 ^a	5.60 ^a	6.00 ^a
B60-25°C	6.20 ^{ab}	5.80 ^{ab}	6.20 ^{abc}	6.00 ^{ab}	5.00 ^a	6.80 ^{ab}	6.60 ^{ab}
C0-4°C	6.80 ^{bc}	6.80 ^{abc}	6.20 ^{abc}	7.00 ^{abc}	6.00 ^{ab}	8.00 ^{ab}	6.80 ^{ab}
C0-25°C	6.60 ^{abc}	6.60 ^{abc}	6.80 ^{abc}	8.60 ^{bc}	7.00 ^{ab}	8.80 ^b	7.40 ^{ab}
C30-4°C	6.60 ^{abc}	6.20 ^{abc}	7.40 ^{abc}	7.00 ^{abc}	7.60 ^b	6.60 ^{ab}	7.80 ^{ab}
C30-25°C	6.20 ^{ab}	6.40 ^{abc}	5.80 ^{ab}	6.60 ^{abc}	7.00 ^{ab}	7.60 ^{ab}	6.00 ^a
C60-4°C	6.20 ^{ab}	7.10 ^{abc}	6.90 ^{abc}	7.40 ^{abc}	5.80 ^{ab}	6.60 ^{ab}	7.60 ^{ab}
C60-25°C	7.60 ^{bc}	6.90 ^{abc}	6.70 ^{abc}	7.20 ^{abc}	6.40 ^{ab}	7.00 ^{ab}	6.30 ^{ab}

a,b,c: Aynı sütunda farklı üstel harflerle gösterilen ortalamalar birbirinden farklıdır- Different lowercase letters denote significant differences on the same column ($P < 0.05$); 0, 30, 60: depolama süreleri (gün)- storage time (day)

SONUÇ

Biyoyaralılığı yüksek olan ve sıklıkla tüketilen gıda maddelerinden biri olan bitter çikolatada probiyotik kültür kullanımının ürünün fonksiyonel özelliklerini daha da arttıracığı düşünölmüştür. Ancak bitter çikolatada probiyotik kültürlerin canlılığını sınırlandıran bileşim, üretim ve depolama koşulları gibi faktörlerin üstesinden gelmek için mikroenkapsölasyon yöntemi önerilmiştir. Bu çalışmada gerek kaplama materyallerinin, gerekse depolama koşullarının probiyotik hücre canlılığı ve çikolatanın duyuşal özellikleri üzerinde etkili olduğı bulunmuştur. 60 günlük depolama periyodu sonunda canlı hücre sayısında ciddi bir düşüş meydana gelmiştir. Bu durum bitter çikolatalarda uzun depolama periyotlarında

probiyotik kültürlerin canlıklarının korunmasını sağılayacak yeni kaplama materyali kombinasyonlarının veya farklı probiyotik kültürlerin denenmesinin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca; probiyotik çikolata üretiminde kullanılan probiyotik kapsüllerin ürünün biyokimyasal ve fiziksel özellikleri üzerindeki etkilerinin de araştırılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada çikolata teminindeki desteğinden ötürü Arge ve Kalite Müdürü Selçuk Arslan'a ve Tören Gıda San. ve Tic. A.Ő'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Alegro, L., Alegro, J., Cardarelli, H., Chiu ,M., Saad, S. (2007). Potentially probiotic and synbiotic

- chocolate mousse. *LWT-Food Sci Technol*, 40: 669-675.
- Akan, E., Kınık, Ö. (2015). Gıda üretimi ve depolanması sırasında probiyotiklerin canlılıklarını etkileyen faktörler. *CBÜ Fen Bil Dergi*, 11(2): 155-166.
- Anakella, K., Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT- Food Sci Technol*, 50, 17-24.
- Ceyhan, N., Alıç H. (2012). Bağırsak mikroflorası ve probiyotikler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (1): 107-113.
- Champagne, C., Raymond, Y., Guertin, N., Belanger, G. (2015). Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. *Int Dairy J*, 47: 109-117.
- Chen, M., Chen, K., Kuo, Y. (2007). Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan-alginate microparticles. *Biotechnol Bioeng*, 98 (2): 411-419.
- Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res Int*, 39, 203-211.
- Chen, K.N., Chen, M.J., Lin, C.W. (2006). Optimum combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *J Food Eng*, 76, 313-320.
- Dharmasena, M.P. (2012). Assessment of viability of probiotic bacteria in non dairy food matrices under refrigeration storage. Master Thesis, Food, Nutrition, and Culinary Sciences, Clemson University, 91p.
- Ding, W.K., Shah, N.P., 2008. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *IFRJ*, 15 (2): 219-232.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. (1987). *Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları 2)*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. Ankara, Türkiye, 381s.
- Erdem, Ö., Özgüven, M.G., Berktaş, I., Erşan, S., Tuna, H.E., Karadağ, A., Özçelik, B., Güneş, G., Cutting, S.M. (2014). Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* HU36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Sci Technol*, 56: 187-193.
- Fahimdanesh M., Mohammadi N., Ahari H., Zanjani M.A.K., Hargalani F.Z., Behrouznasab K. (2012). Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce. *Afr J Microbiol Res*, 6(40): 6853-6858.
- FAO/WHO (2003). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation, Vol. 85., Rome-Italy.
- Foong Y.J., Lee S.T., Ramlı N., Tan Y.N., Ayob M.K. (2015). Incorporation of potential prebiotic lactobacillus plantarum isolated from fermented cacao beans into dark chocolate: bacterial viability and physicochemical properties analysis. *J Food Quality*, 36: 164-171.
- Gadhiya, D., Patel, A., Prajapati, J. (2015). Current trend and future prospective of functional probiotic milk chocolates and related products. *Czech J Food Sci*, 33(4): 295-301.
- Güneş, R., Palabıyık, İ, Kurultay, Ş. (2018). Şekerleme teknolojisinde fonksiyonel ürün üretimi. *Gıda*, 43(6): 984-1001.
- Halkman, K. (2005) *Merck Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları*. Başak Matbaacılık Limited Şti., Ankara, Türkiye, 358s.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Crit Rev Food Sci*, 52: 291-311.
- Hernandez, O.H., Muthaiyan, A., Moreno, F.J., Montilla, A., Sanz, M., Ricke, S.C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiol*, 30, 355-361.
- Kalkan, S., Öztürk, D., Selimoğlu, B.S. (2018) Determining some of the quality characteristics of probiotic yogurts manufactured by using microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Turk J Vet Anim Sci*, 42:617-623.

- Kemsawasd, V., Chaikham, P., Rattanasena, P. (2016). Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. *Food Bioscience*, 16: 37-43.
- Khanafari, A., Porgham, S.H., Ebrahimi, M.T. (2012). Investigation of probiotic chocolate effect on *Streptococcus mutans* growth inhibition. *Jundishapur J Microbiol* 5(4): 590-597.
- Konar, N., Toker, O.S., Oba, S., Sagdic, O. (2016). Improving functionality of chocolate: a review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. *Trends Food Sci Tech*, 49: 35-44
- Malmo, C., Stora, A.L., Mauriello, G. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM17938 cells coated in alginate beads with chitosan by spray drying to use as a probiotic cell in a chocolate soufflé. *Food Bioprocess Technol*, 6: 795-805.
- Mandal S., Hati S., Puniya A.K., Singh R., Singh K., (2013). Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *J Food Process Pres*, 37: 1031-1037.
- Özdamar, K. (1999). *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi*. Kaan Kitabevi, Eskişehir, Türkiye, 535s.
- Possemiers, S., Marzorati M., Verstraete W., Van De Wiele T., 2010. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *Int J Food Microbiol*, 141(1-2): 97-103.
- Patel, P., Parekh, T., Subhash, R. (2008). Development of probiotic and synbiotic chocolate mousse: a functional food. *Biotechnology*, 7(4): 769-774.
- Randazzo, C.L., Pitino, I., Licciardello, F., Muratore, G., Caggia, C. (2013). Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Sci Technol Campinas*, 33(4): 652-659.
- Raymond, Y., Champagne, C.P. (2015). The Use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiol*, 46: 176-183.
- Segers, M.E., Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microb Cell Fact*, 13(1):1-7.
- Succi, M., Tremonte, P., Pannella, G., Tipaldi, L., Cozzolino, A., Coppola, R., Sorrentino, E. (2017). Survival of commercial probiotic strains in dark chocolate with high cocoa and phenols content during the storage and in a static in vitro digestion model. *J Funct Food*, 35: 60-67.
- Toldam, K.S., Larsen, S.K., Saaby, L., Olsen, L.R., Sivenstrup, G., Mullertz, A., Knochel, S., Heimdal, H., Nielsen, D.S., Zielinska, D. (2016). Survival of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* HN019 encapsulated in chocolate during in vitro simulated passage of the upper gastrointestinal tract. *LWT-Food Sci Technol*, 74: 404-410.
- Ünal Turhan, E., Erginkaya, Z., Polat, S., Özer, E.A. (2014). Design of probiotic dry fermented sausage (sucuk) production with microencapsulated and free cells of *Lactobacillus rhamnosus*. *Turk J Vet Anim Sci*, 41: 598-603.
- Ünal, E., Erginkaya Z. (2010). Probiyotik mikroorganizmaların mikrokapsülasyonu. *Food (Gıda)*, 35(4): 297-304.
- Zanjani, M.A.K., Tarzi, B.G., Sharifan, A., Mohammadi, N., Bakhoda, H., Madanipour, M.M. (2012). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. *Afr J Microbiol Res*, 6 (26): 5511-5517.
- Zaric D.B., Bulatovic M.L., Rakin M.B., Kronic T.Z., Loncarevic I.S., Pajin B.S. (2016). Functional, rheological and sensory properties of probiotic milk chocolate produced in a ball mill. *RSC*, 6: 13934-13941.

**TOPRAĞA GÖMEREK VEYA BUZDOLABI KOŞULLARINDA
OLGUNLAŞTIRMANIN SİVAS KÜP PEYNİRİNİN
ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dilşat Bulut Ergin^{1,2}, Nurcan Koca^{1*}

¹Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

²Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekleme Kurumu, Balıkesir İl Koordinatörlüğü, Balıkesir, Türkiye

Geliş / Received: 04.09.2018; Kabul / Accepted: 29.01.2019; Online baskı / Published online: 13.03.2019

Bulut Ergin, D. Koca, N. (2019). Toprağa gömerek veya buzdolabı koşullarında olgunlaştırmanın Sivas Küp peynirinin özellikleri üzerine etkisi. GIDA (2019) 44 (2): 248-259 doi: 10.15237/gida.GD18094

Bulut Ergin, D. Koca, N. (2019). *The effects of ripening of Sivas Kupa (jar) cheese storing under refrigerated conditions or being buried in the soil.* GIDA (2019) 44 (2): 248-259 doi: 10.15237/gida.GD18094

ÖZ

Bu çalışmada, geleneksel olarak uygulanan toprağa gömülerek olgunlaştırma ile son yıllarda yaygınlaşan buzdolabı koşullarında olgunlaştırmanın, Sivas Küp peynirinin bileşimi, lipoliz ve olgunlaşma düzeyi, maya ve küf sayısı ile duyu özellikleri üzerine etkilerinin kıyaslanması amaçlanmıştır. Toprakta olgunlaştırılan peynirlerin olgunlaşma süresince kurumadde, yağ ve protein değerleri buzdolabında olgunlaştırılanlara nazaran daha yüksek, tuz içerikleri ise daha düşük seyretmiştir. Ayrıca, toprakta olgunlaştırılan peynirlerin serbest yağ asitliği değerleri ile olgunlaşma düzeyleri daha yüksek tespit edilmiştir. Üretim sonrasında peynir örneklerinin maya ve küf sayıları 3.81 ± 0.19 log kob/g olarak belirlenmiştir. Olgunlaşmanın 15. gününde, buzdolabı koşullarında olgunlaştırılan peynire kıyasla, toprakta olgunlaştırılan peynirin maya ve küf sayısında daha fazla bir artış tespit edilmiş ve bu durum topraktan peynire bulaşma olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Olgunlaşma süreci sonunda yapılan duyu değerlendirmede, her iki peynir grubu da iyi derecede duyu puanları almasına karşın; görünüş, doku ve tüm izlenim açısından toprakta olgunlaştırılan peynirler nisbeten daha yüksek puanlar almıştır.

Anahtar kelimeler: Sivas Küp peyniri, olgunlaşma, toprak, maya ve küf sayısı, buzdolabı koşulları

**THE EFFECTS OF RIPENING OF SIVAS KUP (JAR) CHEESE STORING
UNDER REFRIGERATED CONDITIONS OR BEING BURIED IN THE SOIL**

ABSTRACT

In this study, it was aimed to compare the composition, lipolysis and ripening level, mold and yeast count and sensory properties of Sivas Kupa cheeses ripened under refrigerated conditions as a recent method or ripened being buried in the soil as a traditional method. The dry matter, fat and protein contents were higher, but the salt content was lower in the cheese ripened in the soil than those of the cheese ripened under the refrigerated conditions. In addition, the free fatty acid values and ripening indexes of cheeses ripened under soil were found high. After production, yeast and mold count of unripened cheese was 3.81 ± 0.19 log cfu/g. On the 15th day of ripening, a greater increase in the number of yeast and mold of cheese ripened in the soil compared to that of the cheese ripened in the refrigerated conditions was determined and this was assessed as an indication of cheese contamination from the soil. At the end of the ripening period, both cheese groups received good sensory scores, but the cheeses ripened in the soil in terms of appearance, texture and overall impression received relatively higher scores.

Keywords: Sivas Kupa cheese, ripening, soil, yeast and mould count, refrigerated conditions

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

E-posta: nurcan.koca@ege.edu.tr

Tel: (+90) 232 311 3029

Faks: (+90) 232 342 7592

GİRİŞ

Son yıllarda, yöresel peynirlerin üretildiği bölgelerin dışında, özellikle büyük şehirlerde de aranır hale gelmesi, üretimlerinin artmasına neden olmuştur. Bu peynirlerin mevcut durumlarının saptanması ve kontrollü koşullarda üretimlerinin gerçekleştirilebilmesi için çalışmaların yapılması, ülke ekonomisine kazandırılması açısından önem arz etmektedir. Yöresel peynirler arasında olan küp peyniri, İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesinde, hemen hemen tüm illerde geleneksel olarak üretilen bir peynir çeşididir. Bazı illerde üretilen çömlek veya testi peyniri ile de benzerdir.

Sivas ve ilçelerinde yaygın olarak üretilen Sivas küp peyniri, peynir mayası ilavesi ile elde edilen ve olgun olarak tüketilen oldukça aromatik ve lezzetli bir peynir çeşididir. Köylülerden alınan bilgilere göre, küp peyniri nisan-ekim ayları arasında tam yağlı ya da kısmen yağı alınmış inek sütünden üretilmektedir. Çiğ süttten enzim ilavesi ile pıhtılandırılmakta ve sonrasında peynir suyunun çıkmasını kolaylaştırmak amacıyla, bıçakla geniş aralıklarla kesim yapılmakta ve 50°C'lere ısıtılmaktadır. Küp peynirlerinde genel olarak haşlama suyu sıcaklığı farklı kaynaklarda 52-80 C olarak bildirilmektedir (Güven ve Karaca, 2004; Pekel ve Korukoğlu, 2009; Kamber ve Terzi, 2008). Pıhtının ısıtılması sonrasında pıhtı peynir suyunun süzülmesi için torbalara doldurulmakta ve yöresel olarak taşlar ile baskı uygulanmaktadır. Elde edilen peynir küçük kalıplar halinde kesildikten sonra tuzlanmakta ve kalıplar halinde küp/kavanoza yerleştirilmektedir. Geleneksel olarak olgunlaşma sırasında ambalaj olarak küpler kullanılmasına karşın, günümüzde kolay bulunabilir ve ucuz olması nedeniyle Sivas küp peyniri plastik kavanozlarda olgunlaştırılmaktadır. Dolum sonrasında kalıp aralarındaki boşlukları gidermek için, çökelek, lor bazen de küp peyniri yapımı için üretilen peynirin kendisi ufalanarak kalıplar arasına doldurulmaktadır. Olgunlaştırma işlemi, köylerde geleneksel olarak peynirle dolu kavanozun ağzı bir bezle kapatıldıktan sonra, ağız kısmı aşağıya gelecek şekilde ters çevrilip ya tamamı ya da yarısı toprağa gömülerek sağlanmaktadır. Tamamının gömülmesi durumunda sıcaklık peynirin her yerinde eşit olarak sağlanabilmektedir. Son yıllarda ise

buzdolabı koşullarında veya soğuk hava depolarında peynir kavanozlarının ağızları delinip ters çevrilerek saklanması tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Peynirden ayrılan suyu uzaklaştırmak içinse kavanozun altına suyu çekecek bezler konulmakta ve zaman zaman bezlerdeki fazla su uzaklaştırılmaktadır. Küp peynirlerinin üretimleri temelde benzemesine karşın, diğer yörelerde üretilen küp peynirlerin üretimleri, Sivas küp peynirinin üretimi ile bazı açılardan farklılık göstermektedir. Örneğin, toprağa gömülerek olgunlaştırılan Hatay iline özgü Carra peynirinin üretim aşamalarında peynirler testi veya PET (polietilen tereftalat) kavanozlara basılmadan önce, çökelek, çörekotu ve kekik karışımından hazırlanan harçla karıştırılmaktadır (Güler, 1999).

Sivas küp peyniri ile yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Pekel ve Korukoğlu (2009), Sivas yöresinden sağlanan 25 adet küp peynirinde kimyasal ve mikrobiyolojik analizler gerçekleştirilerek durum tespiti yapmışlardır. Örnekler arasında gerek bileşim gerekse asitlik değerlerinin oldukça değişken ve maya ve küf sayılarının da oldukça yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar tarafından izole edilen küflerin %93.5'i *Penicillium* cinslerine ait türler olarak tespit edilmiştir. Diğer adlarla üretilen küp peynirleri üzerine de sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Kaptan (2016), evlerde yapılan ve semt pazarlarında satılan farklı illerden (Ankara, Kayseri, Kırşehir, Nevşehir, Niğde, Sivas ve Yozgat) topladığı 279 küp peyniri örneğinde *Listeria* türlerinin varlığını incelemiş ve bazı örneklerde *Listeria monocytogenes* tespit etmiştir. Ankara, Yozgat ve Nevşehir illerinden alınan toprak ambalajlarda olgunlaştırılan küp peynirlerinden 60 örneğin %41'inde 0.016 µg/kg ile 0.136 µg/kg arasında Aflatoksin M1 tespit edilmiş ve bu örneklerin 5 tanesinin uluslararası izin verilen değeri aştığı bildirilmiştir (Koluçak, 2014). Coşkun vd. (2002), yağın ve haşlama işleminin Yozgat küp (çanak) peynirinin nitelikleri üzerine etkilerini incelemişler ve tam yağlı süttten pıhtısı haşlanarak yapılan peynirin duyuşal olarak en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir. Güler (1999), çiğ ve pastörize inek ve keçi sütlerinden üretilen Hatay'ın yöresel Carra peynirlerini, sırlı

testilerde ve polietilen kaplarda toprağa gömerek ya da buzdolabında olgunlaştırmıştır. Carra peyniri ambalajı olarak kullanılan sızdırmaz testilerin yerine şeffaf polietilen kapların da başarı ile kullanılabilceği, 3 ay süre ile toprağa gömme yerine buzdolabında olgunlaştırmanın duysal açıdan oldukça olumlu sonuç verdiği bildirilmiştir. En kaliteli Carra peynirinin pastörize keçi sütünden üretilen ve pet kavanozda buzdolabında olgunlaştırılan peynir olduğu bildirilmiştir.

Yöre halkı tarafından buzdolabında muhafaza edilen Sivas küp peynirlerinin daha uzun süre dayandığı ve peynirlerde acılaşmanın daha az olduğu savunulmaktadır. Buna karşın, toprakta olgunlaştırılarak tüketilen küp peynirinin ise daha çok beğenildiği dillendirilmektedir. Sivas küp peynirinde bu iki olgunlaştırma koşulu arasındaki farkı ve nedenlerini ortaya koyacak literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, bu çalışmada, mahalli peynir çeşitlerimizden olan Sivas küp peynirinin buzdolabında ve toprağa gömülerek iki farklı şekilde olgunlaştırılmasının; peynirin bileşimi, lipoliz ve proteoliz düzeyi, duysal özellikleri ile maya ve küf düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, çalışmada peynir üretiminin tamamen yörede ve varolan koşullarda gerçekleştirilmesi de, gerçek bir durum tespitinin yapılmasına katkı sağlayacaktır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Peynir üretiminde yağı azaltılmış inek sütü ve peynirlerin ambalajlanmasında 1'er kilogramlık plastik kavanozlar kullanılmıştır.

YÖNTEM

Sivas küp peyniri üretimi

Peynir örnekleri, küp peyniri üretiminde Sivas'ın Karşıyaka mahallesinde bir çiftlikte yaygın olarak kullanılan geleneksel yöntemle üretilmiştir. Üretim 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her üretimde 90 litre yağı azaltılmış inek sütü kullanılmıştır. Çiğ süt, bir tülbent yardımıyla süzülmiştir. 32°C'ye ısıtılan süte 17 mL peynir mayası ilave edilmiş (maya kuvveti: 1/8500, Süper marka) ve yaklaşık 45 dakika boyunca pıhtılaşmaya bırakılmıştır. Daha sonra pıhtı bir

oklava yardımıyla 4'e kesilmiş ve peynir suyunun kolayca ayrılması için 15 dakika süreyle ısıtma işlemi (pıhtı sıcaklığı: 48-50°C) gerçekleştirilmiştir (Şekil 1a ve 1b). Arkasından bir kâse yardımıyla peynir suyunu uzaklaştırmak için keselere aktarılmıştır (Şekil 1c). Yaklaşık 20 dakika sonra taşlarla baskılanarak karanlık bir odada 2 gün bekletilmiştir (Şekil 1d). Sonrasında peynirler kalıplar halinde kesilerek tuzlanmış ve ardından 1'er kilogramlık plastik kavanozlara basılmıştır (Şekil 1e ve 1f). Boşluklar, peynir kırıkları ile sıkıca doldurulmuştur. Kavanozun ağız kısmına bir miktar tuz eklenmiş ve kapakları kapatılmıştır. 90 L süttten 8.5 kg peynir elde edilmiştir. Ertesi gün buzdolabında olgunlaştırılacak örnekler için kavanozların kapaklarına bıçak yardımıyla delik açılıp ters çevrilerek, buzdolabına (6-10°C) yerleştirilmiş; toprakta olgunlaştırılacaklar için ise kavanozların ağız bezle bağlanıp ters çevrilerek, serin bir ortamda toprağa tamamıyla gömülmüştür. Bütün örnekler 90 gün boyunca olgunlaşmaya bırakılmış ve hemen üretim sonrası, 15., 30., 60. ve 90. günlerde her bir analiz günü yeni bir kavanoz açılarak peynirler analize tabi tutulmuştur.

Peynir örneklerinin analize hazırlanması

Fiziksel, kimyasal, duysal ve mikrobiyolojik analizler için peynir örnekleri ISO 707/IDF 50 (2008)'ye göre alınmıştır. Önce aseptik teknikle mikrobiyolojik analizler için örnek alınmıştır. Daha sonra kimyasal analizler ve duysal değerlendirmeler için, aynı peynir kavanozlarından bir kaşık yardımıyla peynirler çıkarılmış ve yaklaşık 200 mL hacmindeki temiz kapaklı cam kavanozlara aktarılmıştır. Peynir kalıplarının geri kalan kısımları ise; gerektiğinde kullanılmak üzere -18°C'de saklanmıştır.

Analiz yöntemleri

Bileşim ve asitlik analizleri

Peynir üretiminde kullanılan sütün kurumadde oranı gravimetrik yöntemle (AOAC., 2007a), protein oranı Kjeldahl yöntemiyle elde edilen toplam azot oranının 6.38 faktörü ile çarpılmasıyla (AOAC, 2007b), sütün yağ oranı Gerber yöntemiyle (IDF, 1981) belirlenmiştir. Peynirlerin ise, kurumadde oranı gravimetrik yöntemle (IDF, 1982), yağ oranı Van-Gulik yöntemiyle (TSE,

1978) ve tuz oranı Mohr yöntemiyle (IDF, 1988) belirlenmiştir. Süt ve peynirin asitliği, % laktik asit cinsinden titrimetrik yöntemle (AOAC, 2007c, d,

sırasıyla), pH değerleri ise pH metre ile (WTW marka Inlab Level-1 model) saptanmıştır.



şekil 1. Geleneksel yöntemle deneme peynirlerinin üretimi (a: pıhtının oklava ile kesilmesi, b: pıhtının ısıtılması, c: pıhtının keselere aktarılması, d: baskılanması, e: kesilmiş telemenin tuzlanması, f: kavanozlara basılması)

Figure 1. Traditional production of experimental cheeses (a: cutting the curd into four pieces, b: scalding of curd, c: moving the curd into pouch, d: pressing, e: salting, f: stuffing the cheese into jar)

Serbest yağ asitliği analizi

Peynir örneklerinde yağ ekstraksiyonu, Nunez vd. (1986) ile Öztürk (1993) tarafından belirtilen şekilde bazı küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Rendelenmiş peynir örneğinden 10 g tartılmış ve üzerine 6 g susuz NaSO₄ ilave edilmiş ve bir havan içerisinde ezilmiştir. Daha sonra karışım şilifli-kapaklı erlene alınmış ve 60 mL dietileter ilave edilerek 1 saat bekletilmiştir. Bu süre içerisinde karışım her 15 dakikada 1 dakika süre ile karıştırılmıştır. Sıvı kısım süzümüştür (S&S, 589, beyaz bant). Bu işlem, 20 mL dietileter ilave edilerek 3 kez tekrarlanmış ve süzüntü şilifli erlende toplanmıştır. Erlende toplanan dietileter-yag karışımından, dietileter 50°C'de bir dönerli vakumlu evaporator (Buchi Rotavapor-RE, CH-9230 Flawil, İsviç) yardımı ile vakum altında uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yağ bir erlen içerisine tartıldıktan sonra 10 mL dietileter:etil alkol karışımı (1:1) ilave edilmiş ve 0.05 N etil alkolde hazırlanmış KOH ile %1'lik fenolftalein indikatöründe titre edilmiştir. Sonuç, % oleik asit cinsinden ifade edilmiştir.

Olgunlaşma düzeylerinin belirlenmesi

Suda çözünür azot (SÇA) ve %12 trikloroasetik asitte çözünür azot (TCA-ÇA) oranı Bütikofer vd. (1993) ve Ardö (1999)'ye göre, %5 fosfotungustik asitte çözünür azot (PTA-ÇA) oranı, Jarrett vd. (1982)'ye göre belirlenmiştir. 10 gram peynir örneği, 50 mL 40°C'deki saf su ile Ultra Turrax'da maksimum hızda homojen hale getirilmiş ve homojenat 40°C'de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra yöntemde belirtilen 3000 g'de 30 dakika yerine 4°C ve 4000 rpm/dak.'da 45 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır (Koca, 2002). Elde edilen süspansiyon cam pamuğundan süzümüştür ve süzüntünün 15 mL'si Kjeldahl yöntemi ile azot tayininde kullanılmıştır. Sonuç, suda çözünür azot (%) (SÇA) olarak hesaplanmıştır. Süzüntüden 25 mL alınmış ve üzerine 25 mL trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi (240 g/L) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiş ve filtre kâğıdından (Whatman No. 41) süzümüştür. Süzüntünün tümü Kjeldahl metodu ile azot tayininde kullanılmıştır. Sonuç, TCA'da çözünür azot (%) (TCA-ÇA) olarak verilmiştir. Suda çözünen azot

analizinde elde edilen süzüntüden 5 mL alınmış ve üzerine 3.5 mL H₂SO₄ çözeltisi (3.95 M) ile 1.5 mL fosfotungustik asit (PTA) çözeltisinden (%33.3) ilave edilmiştir. Karışım +4°C'de 1 gece bekletildikten sonra filtre kâğıdından (Whatman No. 42) süzümüştür. Elde edilen süzüntünün azot içeriği Kjeldahl metodu ile saptanmıştır. Sonuç, fosfotungustik asitte çözünür azot (%) (PTA-ÇA) olarak hesaplanmıştır. SÇA, TCA-ÇA, PTA-ÇA değerleri, toplam azot değerlerine oranlanarak, peynir örneklerinin olgunlaşma dereceleri % olarak tespit edilmiştir.

Maya ve küf sayımı

Aseptik koşullarda alınan 10 g peynir örneği, 90 mL Maximum Recovery Diluent (Merck) ile homojen hale getirilmiş, sonra 10⁻⁷'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Merck) bulunan petrilere yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petrilere 25±1°C'de 5 gün boyunca inkübasyona bırakılmış ve 10-150 koloni arasındaki petrilere hesaplamaya alınmıştır. Sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir (FDA, 2001).

Duyusal değerlendirme

Sivas küp peynirinin duyuşal değerlendirmesi puanlama yöntemiyle yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle peynirin duyuşal kalite kriterleri ve bu kalite kriterlerine karşılık gelen puanlar farklı üreticilerden temin edilen küp peynirleri kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, panelistlere söz konusu örnekler ile eğitim verilmiştir. Duyusal değerlendirme, Sivas küp peynirini tanıyan 9 panelist ile gerçekleştirilmiştir. Panelistlerden belirlenen puanlama kriterlerine göre 1-5 arasında peynir örneklerini görünüş, doku, lezzet ve tüm izlenim açısından değerlendirmeleri ve ayrıca puan düşüşlerine neden olan kusurları işaretlemeleri istenmiştir.

İstatistiksel analizler

Analiz sonuçlarının varyans analizi ile değerlendirilmesinde ise, iki faktör (olgunlaşma koşulu ve depolama süresi) üzerinden iki yönlü varyans analizi uygulanmış ve önemli çıkan faktörlerin ortalamaları Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla, SPSS (sürüm 16.0) ticari istatistik paketi kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Peynir üretiminde kullanılan çiğ inek sütünün kurumadde oranı 11.67 ± 0.23 , yağ oranı 2.17 ± 0.15 , protein oranı 3.01 ± 0.06 olarak tespit edilmiştir. Sütlerin pH değerleri 6.70 ± 0.08 , titrasyon asitliği değerleri ise laktik asit cinsinden 0.21 ± 0.01 olarak bulunmuştur.

Peynir üretimi boyunca süt ve pıhtının pH'sı takip edilmiştir. Maya ilavesi sırasında sütün pH değeri 6.62, pıhtılaşma işlemi sonunda 5.98, pıhtının ısıtılması sonrasında 5.82 olarak tespit edilmiş, peynirin kavanoza yerleştirilmesi aşamasında ise pH değeri 4.91'e düşmüştür. Toprağa gömülen ve buzdolabında depolanan peynirler 90 gün boyunca üretim sonrası, 15., 30., 60. ve 90. günlerde fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Duyusal analiz ise, çiğ süt kullanılması sebebiyle olgunlaşma süresi sonunda gerçekleştirilmiştir.

Peynirin bileşimi ve asitliği üzerine etkisi

Hem toprakta hem de buzdolabında olgunlaştırılan peynirlerin pH değerlerinde olgunlaşma süresince artış saptanmıştır (Çizelge 1). Ancak, toprakta olgunlaşan peynirlerin pH değerleri, buzdolabında olgunlaşan peynirlere kıyasla olgunlaşmanın 30. gününden itibaren daha yüksek seyretmiştir ($P < 0.01$). Farkye ve Fox (1990), üretim sırasında ve olgunlaşmanın ilk aşamalarında pıhtıda kalan laktozun parçalanması sonucu laktik asit oluşumu nedeniyle peynir çeşidine bağlı olarak pH'nın düştüğünü, olgunlaşma sırasında ise laktik asitin başka ürünlere parçalanması ve/veya alkali azotlu bileşiklerin oluşumuyla peynir pH'sının arttığını bildirmektedir. Bu artış özellikle küflü peynirlerde daha belirgin olmaktadır. Araştırmalarda Trieu-Cout ve Gripon (1982) ile Karahadian ve Lindsay (1987), Camembert peynirlerinin pH'sının 4.8'lerden 7.5'lere kadar, Godinho ve Fox (1982), mavi küflü peynirlerde 4.8'lerden 7'lere kadar arttığını saptamışlardır. Çalışmada da Sivas küp peynirlerinin pH değerlerinin artışı, hatta bu artışın toprakta olgunlaştırılanlarda daha fazla oluşu, peynirlerin küf oranının yüksek olması ile açıklanabilir. Buna karşın, peynirlerin olgunlaşma şekillerinin (toprak, buzdolabı), peynirlerdeki titrasyon asitliği değerleri üzerine etkisi istatistiksel

olarak önemli bulunmamıştır ($P > 0.05$). Bu değerler her iki grup için de ilk 15 gün içinde azalmış, daha sonra artış göstermiştir ($P < 0.01$). Bu durum, olgunlaşma boyunca laktik asit oluşumu ve laktik asidin küfler tarafından başka ürünlere parçalanması arasında denge ile ilişkilendirilebilir.

İlk 15 gün içinde her iki grupta da kurumadde değerlerinde önemli bir artış saptanmıştır. Bu artış, toprakta olgunlaştırılan peynirde daha belirgindir ($P < 0.05$). Bu durum, peynir suyunun süzülmeyle devam etmesiyle açıklanabilir. Nitekim üretim sonrasında kavanozların kapakları delinmiş ve ters çevrilerek olgunlaşmaya bırakılmıştır. Daha sonraki günlerde ise, kurumadde değerlerinde önemli bir değişim belirlenmemiştir. Olgunlaştırma süresince protein ve yağ oranlarında, her iki grup için de kurumadde değerlerine paralel olarak doğrusal bir artış saptanmıştır. Toprakta olgunlaştırılan peynirlerin kurumadde oranlarının yüksek olması sebebiyle, yağ ve protein içerikleri de daha yüksek tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Yağ ve protein oranlarındaki eğilimin tam tersi şekilde, peynir örneklerinin olgunlaşma süresince tuz içeriklerinde azalma tespit edilmiştir. Bu azalma ise, olgunlaşma süresince peynirden ayrılan suyla birlikte bir miktar tuzun da uzaklaşmasıyla açıklanabilir. Toprakta olgunlaştırılan peynirlerde kurumadde oranlarında 15. günde daha belirgin bir artış nedeniyle, su kaybının daha hızlı olduğunu söylemek mümkündür. Nitekim bu peynirlerin doldurulduğu kavanozlar kapaksız bir şekilde ağız kısımları kumaş parçalarıyla bağlanarak toprağa gömülmüştür. Bu durum, toprakta olgunlaştırılan peynirlerde bu tuz oranında azalmanın, olgunlaşmanın daha erken (15.gün) safhalarında gerçekleşmesine neden olmuştur. 60. günden itibaren her iki grup için yakın tuz değerleri elde edilmiştir.

Peynirin maya-küf sayısı üzerine etkisi

Sivas küp peyniri örneklerinin maya ve küf sayısı üretim sonrasında yüksek seviyede (3.81 ± 0.19 log kob/g) tespit edilmiştir. Bu durum, tamamen geleneksel olarak yapılan üretim sırasında her ne kadar temizliğe dikkat edilse de, önemli düzeyde bir küf bulaşmasının söz konusu olduğunu

göstermektedir. Özellikle, Sivas küp peyniri üretim yönteminde bahsedildiği gibi, üretilen taze peynirler tuzlanıp kavanozlara yerleştirilmeden önce 2 gün taş kalıplarla baskılanmıştır. Bu aşama, küf bulaşması için oldukça uygun bir ortam yaratmaktadır. Her iki olgunlaşma şeklinde de olgunlaşma süresince maya ve küf sayısında artış saptanmıştır. Bu artış, toprakta olgunlaştırılan peynirde ilk 15 günde daha belirgin olmuştur.

Toprak, küflerin bulaşma kaynaklarından birisidir. Bu nedenle toprakta olgunlaştırılan grupta özellikle başlangıçta görülen bu yükseklik, topraktan peynire küf bulaşması ile açıklanabilir. Pekel ve Korukoğlu (2009)'da, Sivas yöresinden sağladıkları 25 adet küp peynirinde oldukça yüksek maya ve küf sayıları (ortalama 7.57 log kob/g) tespit etmişlerdir.

Çizelge 1. Sivas küp peynirlerinin olgunlaşma süresince bileşim ve asitlik değerlerindeki değişimler (ortalama±standart sapma)

Table 1. The changes in composition and acidity of Sivas küp cheese during ripening period (mean±standard deviation)

		Olgunlaşma süresi (Gün) / Ripening period (Day)				
		0	15	30	60	90
Kurumadde (%)	T	46,80±0,80 ^a	55,45±0,85 ^{bx}	55,44±0,92 ^{bx}	55,11±0,87 ^{bx}	54,88±0,74 ^{bx}
	B	46,80±0,80 ^a	51,41±1,14 ^{by}	52,70±1,27 ^{by}	52,63±1,33 ^{bx}	52,29±1,58 ^{bx}
Yağ (%)	T	24,33±1,53 ^{ax}	25,33±1,53 ^{abx}	26,52±1,30 ^{abx}	27,67±1,15 ^{bex}	29,35±1,05 ^{cx}
	B	24,33±1,53 ^{abx}	23,30±1,49 ^{ax}	24,26±1,51 ^{aby}	25,46±1,56 ^{aby}	26,83±1,26 ^{by}
Protein (%)	T	19,02±0,13 ^a	20,05±0,45 ^{cx}	19,87±0,40 ^{bex}	19,42±0,39 ^{abex}	19,22±0,29 ^{abx}
	B	19,02±0,13 ^{ab}	18,75±0,38 ^{ay}	19,20±0,26 ^{bx}	19,71±0,10 ^{cx}	19,77±0,06 ^{cy}
Tuz (%)	T	6,68±0,10 ^d	4,97±0,12 ^{cx}	4,58±0,23 ^{bx}	4,38±0,19 ^{abx}	4,27±0,11 ^{ax}
	B	6,68±0,10 ^d	6,18±0,08 ^{cy}	5,64±0,27 ^{by}	4,20±0,09 ^{ax}	4,12±0,07 ^{ax}
KM'de yağ (%)	T	51,97±2,4 ^c	45,67±2,14 ^{ax}	47,82±1,54 ^{abx}	50,19±1,32 ^{bex}	53,47±1,40 ^{cx}
	B	51,97±2,4 ^b	45,31±2,24 ^{ax}	46,06±3,34 ^{abx}	48,43±3,90 ^{abx}	51,39±3,87 ^{abx}
KM'de protein (%)	T	40,65±0,82 ^b	36,16±0,73 ^{ax}	35,84±0,97 ^{ax}	35,25±1,09 ^{ax}	35,02±0,91 ^{ax}
	B	40,65±0,82 ^b	36,48±0,59 ^{ax}	36,45±1,30 ^{ax}	37,47±0,92 ^{ax}	37,82±1,09 ^{ay}
KM'de tuz (%)	T	14,27±0,38 ^d	8,97±0,10 ^{cx}	8,25±0,27 ^{bx}	7,95±0,23 ^{abx}	7,79±0,11 ^{ax}
	B	14,27±0,38 ^d	12,02±0,14 ^{cy}	10,72±0,67 ^{by}	7,99±0,34 ^{ax}	7,89±0,35 ^{ax}
pH	T	4,82±0,12 ^a	4,91±0,02 ^{ax}	5,11±0,01 ^{bx}	5,24±0,0 ^{cx}	5,31±0,02 ^{cx}
	B	4,82±0,12 ^a	4,90±0,01 ^{abx}	4,99±0,03 ^{by}	5,18±0,0 ^{cx}	5,18±0,03 ^{cy}
TA (%LA)	T	1,54±0,07 ^c	0,95±0,04 ^{ax}	1,20±0,06 ^{bx}	1,57±0,06 ^{cx}	1,67±0,04 ^{dx}
	B	1,54±0,07 ^c	1,06±0,12 ^{ax}	1,26±0,06 ^{bx}	1,49±0,07 ^{cx}	1,61±0,07 ^{cx}

T: Toprakta olgunlaştırılan peynir (*the cheese ripened being burried in soil*)

B: Buzdolabın koşullarında olgunlaştırılan peynir (*the cheese ripened under refrigerated conditions*)

a-c: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler birbirinden farklıdır (P <0.05).

a-c: The mean values shown in different letters on the same line are different (P <0.05)

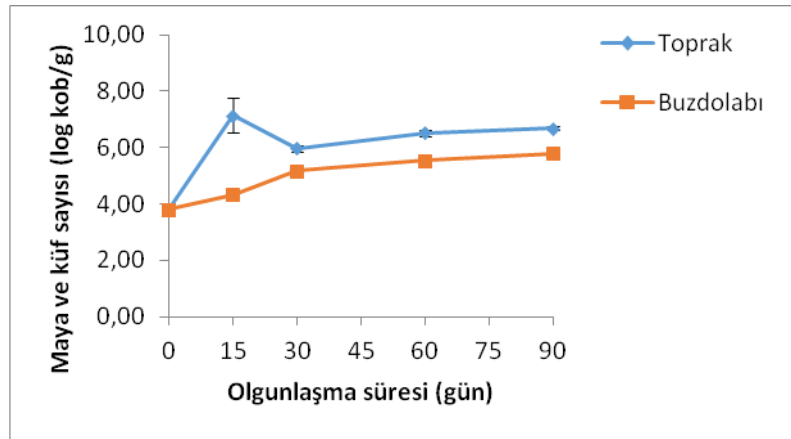
x-y: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler birbirinden farklıdır (P <0.05)

x-y: The mean values shown in different letters in the same column are different (P <0.05)

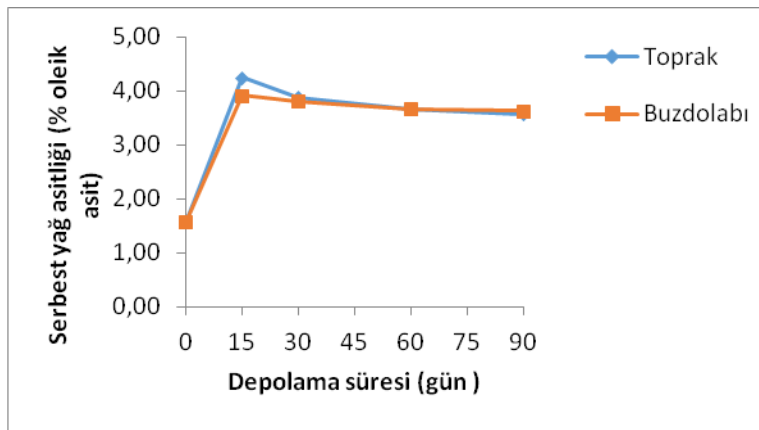
Peynirin lipolizi ve proteolizi üzerine etkisi

Her iki grup peynirde de serbest yağ asitliği değerleri olgunlaşmanın ilk 15 gününde hızla artmış (P <0.01, Şekil 3), sonrasında ise çok fazla olmamakla birlikte peynirlerin serbest yağ asitliği değerlerinde düşüşler meydana gelmiştir (P >0.05). Benzer bir durum, Dervişoğlu ve Yazıcı (2001) tarafından Külek peynirinde de bildirilmiştir. Araştırmacılar lipolitik aktiviteye

sahip mikroorganizmaların olgunlaşma işleminin ilk bir ayında hızla arttığını, fakat daha sonra pek fazla değişmediğini belirtmişlerdir. Olgunlaşma süresince serbest yağ asitleri metil ketonlara dönüşebilmekte veya bazı yağ asitleri de küfler tarafından enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Nitekim Sivas küp peyniri örneklerinde de küf sayıları oldukça yüksektir.



Şekil 2. Sivas küp peynirlerinin olgunlaşma süresince küf ve maya sayıları
Figure 2. Mold and yeast counts of Sivas küp cheeses during ripening



Şekil 3. Sivas küp peynirlerinin olgunlaşma süresince serbest yağ asitliği değerleri
Figure 3. Free fatty acid values of Sivas küp cheeses during ripening

Toprakta olgunlaşan peynirlerin SÇA, TCA-ÇA ve PTA-ÇA değerleri, olgunlaşma süresince buzdolabında olgunlaşan peynirlerin değerlerine kıyasla daha yüksek seyretmiştir ($P < 0.05$, Çizelge 2). Her iki olgunlaştırma şeklinde de bu değerler olgunlaşma ilerledikçe artış göstermiştir ($P < 0.01$). Peynirde tuz lezzet ve kaiteye etki ederken, peynirin korunmasında da rol oynar. Tuz gıdaların sıvı fazındaki osmotik basıncı artırır, böylece bakteri hücrelerinin dehidrasyonuna sebep olarak ya ölmelerine ya da gelişimlerinin engellenmesine yol açar. Dolayısıyla peynirdeki tuz oranı, mikrobiyolojik ve enzimatik aktiviteleri etkileyerek, glikoliz, lipoliz ve proteoliz düzeylerini etkiler (Guinee, 2007). Toprakta olgunlaştırılan peynirlerin tuz oranı, olgunlaşmanın erken dönemlerinde buzdolabında

olgunlaştırılanlara kıyasla daha düşük seyretmiştir. Bu durum, toprakta olgunlaştırılan peynirlerde proteoliz oranının yüksek olmasında tuz oranının da etkin bir faktör olduğunu düşündürmüştür.

SÇA bazında olgunlaşma düzeyi her iki grupta da ilk 15 gün içinde önemli bir artışla neredeyse iki katına çıkmış ve 30. ve 60. günlerde bu artış yavaşlamıştır. TCA-ÇA bazında olgunlaşma düzeyi ise, 15. ve 30. günlerde önemli bir artış göstermiş ve daha sonra neredeyse stabil kalmıştır. PTA-ÇA bazında olgunlaşma düzeyi ise her ne kadar düzenli olarak olgunlaşma süresince artsa da, bu artış 60. ve 90. günlerde oldukça belirgin düzeye gelmiştir. Bu üç farklı olgunlaşma kriterinin gün bazında bu değişimleri, ekstraksiyonda temsil ettikleri azot fraksiyonları

ve bunların birbirine dönüşümü ile açıklanabilir. Su ile ekstraksiyonda kazein dışındaki protein, tüm peptitler, aminoasitler, aminler, üre ve amonyak gibi bileşikler alınırken, TCA ile ekstraksiyonda ise orta ve küçük molekül ağırlıklı peptitler ile aminoasitler, aminler, üre ve amonyak gibi bileşikler analiz edilebilmektedir (Hayaloğlu vd., 2011). Nitekim, analizde TCA-ÇA tayininde suda çözünür fraksiyon kullanılmış ve büyük molekül ağırlıklı peptitler çöktürülmüştür. PTA ile ekstraksiyonda ise sadece çok düşük molekül ağırlıklı peptitler ile aminoasitler elde edilmektedir

(Hayaloğlu vd, 2011). Olgunlaşma düzeyi ilerledikçe, küçük molekül ağırlıklı peptitlere parçalanmanın ve aminoasit oluşumunun artışı dikkate alındığında PTA-ÇA bazında olgunlaşma düzeyinin ileri olgunlaşma günlerinde artışı anlamlıdır. SÇA bazında olgunlaşmayı değerlendirdiğimizde ise, büyük molekül peptit oluşumunun olgunlaşma başında belirgin olması ve daha sonra bu peptitlerin daha küçük molekül ağırlıklı peptitlere parçalanması, olgunlaşmanın erken safasında SÇA bazında olgunlaşmanın hızlı artışını açıklamaktadır.

Çizelge 2. Sivas küp peynirlerinin olgunlaşma süresince olgunlaşma derecelerindeki değişimler (ortalama±standart sapma).

Table 2. The changes in ripening levels of Sivas küp cheeses during ripening period (mean±standard deviation)

		Olgunlaşma süresi (Gün) / Ripening period (Day)					
		0	15	30	60	90	
SÇA (%)	T	0,33±0,03 ^a	0,63±0,01 ^{bx}	0,71±0,02 ^{bx}	0,86±0,01 ^{cx}	1,36±0,10 ^{dx}	
	B	0,33±0,03 ^a	0,53±0,03 ^{by}	0,63±0,01 ^{cy}	0,78±0,01 ^{dy}	0,93±0,01 ^{ey}	
TCA-ÇA (%)	T	0,07±0,01 ^a	0,16±0,02 ^{bx}	0,22±0,03 ^{cx}	0,24±0,04 ^{cx}	0,25±0,04 ^{cx}	
	B	0,07±0,01 ^a	0,15±0,02 ^{bx}	0,19±0,01 ^{cx}	0,20±0,01 ^{cdx}	0,22±0,03 ^{dx}	
PTA-ÇA (%)	T	0,03±0,01 ^a	0,06±0,0 ^{bx}	0,09±0,01 ^{cx}	0,20±0,03 ^{dx}	0,33±0,01 ^{ex}	
	B	0,03±0,01 ^a	0,04±0,00 ^{ay}	0,05±0,01 ^{by}	0,10±0,01 ^{cy}	0,25±0,01 ^{dy}	
Olgunlaşma İndeksleri (%)	PTA-TCA-SÇA	T	10,96±0,87 ^a	20,04±0,62 ^{bx}	20,62±0,62 ^{bcx}	21,66±0,66 ^{cdx}	22,47±1,18 ^{dx}
		B	10,96±0,87 ^a	17,64±1,26 ^{by}	19,14±0,81 ^{bcx}	19,51±0,55 ^{cdy}	20,89±0,45 ^{dx}
	PTA-ÇA	T	1,99±0,06 ^a	5,16±0,48 ^{bx}	6,50±0,42 ^{cx}	7,20±0,79 ^{cx}	7,53±0,070 ^{cx}
		B	1,99±0,06 ^a	5,50±0,23 ^{bx}	6,00±0,28 ^{bcy}	6,17±0,48 ^{cy}	6,98±0,36 ^{dy}
	TCA-ÇA	T	0,90±0,21 ^a	1,82±0,14 ^{bx}	2,94±0,23 ^{cx}	6,48±0,79 ^{dx}	10,69±0,31 ^{ex}
		B	0,90±0,21 ^a	1,37±0,19 ^{ay}	1,76±0,17 ^{by}	3,28±0,29 ^{cy}	8,18±0,17 ^{dy}

T: Toprakta olgunlaştırılan peynir (the cheese ripened being buried in soil)

B: Buzdolabı koşullarında olgunlaştırılan peynir (the cheese ripened under refrigerated conditions)

a-c: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler birbirinden farklıdır (P < 0.05).

a-c: The mean values shown in different letters on the same line are different (P < 0.05)

x-y: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler birbirinden farklıdır (P < 0.05).

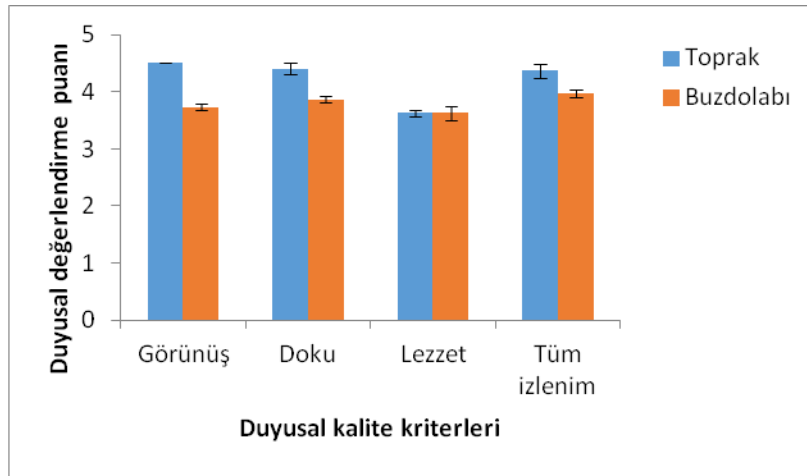
x-y: The mean values shown in different letters in the same column are different (P < 0.05)

Peynirin duyuşsal özellikleri üzerine etkisi

Olgunlaşma süreci sonunda yapılan duyuşsal değerlendirme de toprakta olgunlaşan ve buzdolabı koşullarında olgunlaşan peynirler benzer lezzet puanları almıştır. Buna karşın, görünüş, doku ve tüm izlenim açısından ise toprakta olgunlaştırılan peynirler daha yüksek puanlar almıştır (P < 0.05, Şekil 4).

Duyuşsal değerlendirmede, panelistlerden puan düşüşlerinin nedenlerini belirtmeleri de istenmiştir. Panelistler tarafından toprakta olgunlaştırılan peynirlerin renginin daha krem,

buzdolabında koşullarında olgunlaştırılan peynirlerin renklerinin ise daha beyaz olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte, panelistler tarafından buzdolabında olgunlaştırılan peynirlerde hafif kumlu yapı belirlenmiş ve toprakta olgunlaştırılan peynirlere kıyasla kırılabilirliğin daha fazla hissedildiği ifade edilmiştir. Toprakta olgunlaştırılan peynirler ise, buzdolabındakilere nazaran daha sert olarak algılanmıştır. Her iki grup da tuzlu olarak nitelendirilmiştir. Toprakta olgunlaştırılan peynirlerde hafif küfümsü lezzet varlığı da ifade edilmiştir.



Şekil 4. Sivas küp peynirlerinin olgunlaşma süresi sonunda duyu değerlendirme puanları
 Figure 4. Sensory scores of Sivas küp cheeses at the end of ripening period

SONUÇ

Bu çalışmada, geleneksel yöntemle üretilen Sivas küp peynirinin plastik kavanozlarda toprağa gömülerek ve buzdolabında olgunlaştırılmasının, peynirin nitelikleri üzerinde yarattığı farklılıklar ortaya koyulmuştur. Her iki grupta da ambalajın ters kapatılıp peynir suyunun uzaklaştırılmasının devam etmesi nedeniyle, özellikle 15. günde kurumadde oranı önemli seviyede artmıştır. Kurumaddenin artışı ile birlikte yağ ve protein oranları artarken, peynir suyu ile tuzun uzaklaşması sebebiyle tuz oranı azalmıştır. Bu değişimler toprakta olgunlaştırılan peynirde daha belirgindir. Peynirlerde lipoliz ilk 15 gün içinde hızla gerçekleşmiş ve sonrasında devam etmemiştir. Örneklerde SÇA değerlerinde artış olgunlaşmanın başlangıcında, PTA-ÇA değerlerinde artış ise olgunlaşmanın ileri safhalarında daha belirgin seyretmiştir. Peynir örneklerinde olgunlaşma süresince maya ve küf sayısı artmış, özellikle bu artış toprakta olgunlaştırılan peynirde daha yüksek bulunmuştur. Özellikle ilk 15 günde toprakta olgunlaştırılan peynirde maya ve küf sayısındaki hızlı sıçrayış, topraktan bu mikroorganizmaların bulaştığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Olgunlaşmanın sonunda yapılan duyu değerlendirilmede, her iki grup da bütün kriterler açısından genel olarak iyi puanlar almıştır. Lezzet açısından benzer değerler almış, ancak doku, görünüş açısından toprakta olgunlaştırılan peynir nisbeten daha yüksek puanlar almıştır. Sonuç

olarak, her iki olgunlaştırma yönteminin de Sivas küp peynirinde kullanılabileceği, ancak maya ve küf sayılarının yüksek olması nedeniyle üretim ve olgunlaştırma aşamalarının gıda güvenliği açısından da araştırılması gerekliliği ortaya koyulmuştur.

TEŞEKKÜR

Peynir üretiminin gerçekleştirilmesinde desteği için Türk Veteriner Hekimler Birliği Sivas Odası Başkanı Sayın Özcan Karataş'a ve laboratuvarlarını kullanıma açtıkları için Sivas Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'ne ve çalışanlarına çok teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

AOAC (2007a). Solids (total) in milk, AOAC Official Method 990.20, Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MA, USA.

AOAC (2007b). Nitrogen (total) in milk, AOAC Official Method 991.20, Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Edition, AOAC International, Gaithersburg, MA, USA.

AOAC (2007c). Acidity of milk, AOAC Official Method 947.05, Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MA, USA.

AOAC (2007d). Acidity of cheese, AOAC Official Method 920.124, Official Methods of

- Analysis of AOAC International, 19th Ed., AOAC International, Gaithersburg, MA, USA.
- Ardö, Y. (1999). Evaluating proteolysis by analysing the N content of cheese fractions. In: *Chemical Methods for Evaluating Proteolysis in Cheese Maturation*. *Bull Int Dairy Fed*, 2 (337): 4-9.
- Bütikofer, U., Ruegg, M., Ardö, Y. (1993). Determination of nitrogen fractions in cheese: Evaluation of collaborative study, *Lebensm-Wiss. u- Tech*, 26:271-275.
- Coşkun, S., Konar, A., Güven, M. (2002). Küp (çanak) peynirlerinin özellikleri üzerine sütün yağ oranının ve pıhtıya uygulanan ısı işleminin etkileri. *Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17 (2): 668.
- Dervişoğlu M., Yazıcı, F. (2001). Ripening changes of Kulek cheese in wooden and plastic containers. *J Food Eng*, 48: 243-249.
- Farkye, N. Y., Fox, P.F. (1990). Objective indices of cheese ripening. *Trends Food Sci Technol*, 1(2): 37-40.
- FDA (2001). Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition. Chapter 18, BAM: Yeasts, Molds and Mycotoxins, New Hampshire, ABD.
- Hayaloğlu, A.A., Topçu, A., Koca, N. (2011). Peynir analizleri. Bölüm 17, *Peynir Biliminin Temelleri*. A.A. Hayaloğlu, B. Özer (Ed). Sidaş Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye, s: 489-562
- Godinho, M., Fox, P.F. (1982). Ripening of Blue cheese: influence of salting rate on proteolysis. *Milchwissenschaft*, 37: 72-75.
- Guinee, T.P. (2007). Introduction: what are the functions of NaCl in cheese? Chapter 39, *Cheese Problem Solved*. P:L.H. McSweeney (Ed). CRC Press, Woodhead Publishing Lmt. Cambridge, England. pp: 80-81.
- Güler, M.B. (1999). Hatay Yöresi Sürk (Küflü Çökelek) ve Carra (Testi) peynirlerinin üretimi, özellikleri ve standardizasyon olanakları üzerine bazı araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Çukurova, Türkiye, 118 s.
- Güven, M., Karaca, O.B. (2004) Yozgat yöresinde üretilen Küp (Çanak) peynirlerinin yapım tekniği ve özellikleri, Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül 2004, Van, Türkiye,
- IDF (1981). Milk – Determination of fat content – Gerber Butyrometers. IDF Standard 105, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- IDF (1982). Determination of the total solid content (cheese and processed cheese). IDF Standard 4A, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- IDF (1988). Determination of salt content (Mohr method). IDF Standard 12B, International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- ISO (2008). Milk and milk products - Guidance on sampling. 707/IDF 50, Organization for Standardization and International Dairy Federation, Switzerland.
- Jarrett, W.D., Aston, J.W., Dulley, J.R. (1982). A simple method for free amino acids in Cheddar cheeses. *Aust J Dairy Technol*, 37: 55-58.
- Kamber, U., Terzi, G. (2008). The traditional cheeses of Turkey: Central Anatolian Region, *Food Rev Int*, 24: 74-94.
- Kaptan, B. (2016). Prevalence of *Listeria* spp and *L.monocytogenes* in home made pottery cheese. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 13(1): 80-87.
- Koca, N. (2002). Bazı yağ ikame maddelerinin yağ azaltılmış kaşar peynirinin nitelikleri üzerine etkileri. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, 227 sayfa.
- Karahadian, G., Lindsay, R.C. (1987). Integrated roles of lactate, ammonia and calcium in texture development of mold surface ripened cheeses. *J Dairy Sci* 70: 909-918.
- Koluçak, H.A. (2014). Toprak ambalajda olgunlaştırılan geleneksel küp peynirlerinde Aflatoksin M1 düzeyinin belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, Türkiye, 30 s.
- Nunez, M., Garsía-Aser, C., Rodriguaz-Martin, M.A., Medina, M., Gaya, P. (1986). The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipolysis in Manchego Cheese. *Food Chem*, 21: 115-123.

Öztürk, G.F. (1993). Kaşar peynirlerinin olgunlaştırılmasının hızlandırılması üzerine nötral proteaz ve nötral proteaz-lipaz enzim kombinasyonunun etkisi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir, Türkiye, 105 s.

Pekel, M., Korkoğlu, M. (2009). Sivas yöresinde üretilen Küp peynirinin mikrobiyolojik, kimyasal kalitesi ve küf florasının belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(1): 1-7.

Trieu-Cout, P., Gripon, J.C. (1982). A study of proteolysis during camembert cheese ripening using isoelectrofocusing and two-dimensional electrophoresis. *J Dairy Res*, 49: 501-510.

TSE (1978). Peynirde yağ miktarı tayini, No:3046, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

DEPO BAĞIL NEMİ VE SICAKLIĞININ SARAY HELVASININ KALİTESİNE ETKİLERİ

Özer Atıl¹, Zehra Gülsünoğlu², Meral Kılıç-Akyılmaz^{2*}

¹Polen Un ve Gıda Katkı Maddeleri San. Tic. A.Ş., İstanbul

²İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul

Geliş / Received: 16.04.2018; Kabul / Accepted: 04.02.2019; Online baskı / Published online: 15.03.2019

Atıl, Ö., Gülsünoğlu, Z., Kılıç-Akyılmaz, M. (2018). Depo bağıl nemi ve sıcaklığının saray helvasının kalitesine etkileri. *GIDA* (2019) 44 (2): 260-273 doi: 10.15237/gida.GD18050

Atıl, O., Gülsunoglu, Z., Kılıç-Akyılmaz, M. (2018). Effects of storage relative humidity and temperature on quality of palace halva. *GIDA* (2019) 44 (2): 260-273 doi: 10.15237/gida.GD18050

ÖZ

Saray helvası Türkiye'ye özgü geleneksel unlu bir şekerlemedir. Gevrek, lifli ve düşük su aktiviteli bir ürün olmasından dolayı depolama sırasında öncelikle fiziksel bozulmalar görülmektedir. Bu çalışmada, depo bağıl neminin ve sıcaklığının saray helvasının kalitesine etkileri incelenmiştir. Saray helvası numuneleri 25 ve 35°C'de %22-90 arasında farklı bağıl nemlerde denge nemine ulaşıncaya kadar depolanmıştır. Üründeki kalite değişimlerini belirlemek amacıyla, depolama öncesi ve sonrasında nem içeriği, su aktivitesi, sertlik, oksidasyon düzeyi, renk ve X-ışını kırınımı ölçümleri yapılmıştır. Saray helvasının adsorpsiyon izotermi belirlenmiştir. Taze saray helvasının su aktivitesinin 0.21 olduğu ve camsı halde bulunduğu saptanmıştır. Saray helvasının camsı yapısının 25°C'de %54 ve 35°C'de %32 bağıl nemde korunmadığı ve hal değişimi sonucunda kristal yapı oluştuğu gözlenmiştir. Her iki sıcaklıkta da bağıl nemin artmasıyla sertlikte önce bir artış daha sonra bir azalış gözlenmiştir. Bağıl nem ve sıcaklık arttıkça üründe Maillard reaksiyonu sonucunda renk değişimi ve oksidasyon sonucunda TBARS değerinde artış meydana gelmiştir.

Anahtar kelimeler: Saray helvası, depolama, bağıl nem, bozulma.

EFFECTS OF STORAGE RELATIVE HUMIDITY AND TEMPERATURE ON QUALITY OF PALACE HALVA

ABSTRACT

Palace halva is a traditional flour-containing confectionery of Turkey. Primarily, physical deterioration is observed in this halva due to its brittle-fibrous structure and low a_w . In this study, effects of storage relative humidity (RH) and temperature on quality of palace halva were investigated. Halva samples were stored at different RH (22-90%) at 25-35°C until equilibrium moisture content was reached. Moisture content, a_w , hardness, oxidation, color and X-ray diffraction measurements were made before and after storage. Adsorption isotherms of palace halva were determined. Fresh palace halva had a_w of 0.21 and glassy structure. Glassy structure of palace halva was not preserved at RH of 54% at 25°C and 32% at 35°C and crystalline structure formed because of state change. Hardness of halva increased and then decreased as RH was increased. Color change by Maillard reaction and increase in TBARS by oxidation occurred in the product as RH and temperature were increased.

Key words: Palace halva, storage, relative humidity, deterioration.

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ meral.kilic@itu.edu.tr

☎ (+90) 212 285 6016

☎ (+90) 212 285 8333

GİRİŞ

Unlu şekerlemeler temel bileşenleri un, şeker ve yağ olan ülkemize özgü geleneksel ürünlerdir. Unlu şekerlemeler sınıfına örnek olarak pişmaniye ve saray helvası verilebilir. Bu iki ürün de özellikle İzmit ve Kastamonu yöresinde üretilmekte olup Türkiye'de yaygın olarak ve yurt dışında da tüketilmektedir. Saray helvası, Türk Standartları Enstitüsü'nün TS 9999 sayılı standardına göre "Beyaz şeker, buğday unu, tereyağı, bitkisel margarin ve/veya yemeklik bitkisel sıvı yağlar, sitrik asit, gerektiğinde katkı ve çeşni maddeleri de ilave edilerek tekniğine uygun şekilde hazırlanan bir mamul" olarak tanımlanmaktadır (TSE, 1992). Standartta göre saray helvasında bulunabilecek en fazla su, şeker ve yağ oranları sırasıyla %6, %50 ve %16'dır.

Saray helvası bileşimi ve üretimi konusunda literatürdeki bilgiler kısıtlıdır. Ancak şekerlemelerin genel üretim yöntemleri esas alınarak ve kısıtlı kaynaklara dayanarak üretim hakkında bilgiler verilebilir. Saray helvasının üretiminde öncelikle yaklaşık olarak %75 şeker ve %25 su karışımı 160-170°C'ye ısıtılır ve bu karışıma yaklaşık %0.05 oranında sitrik asit eklenir ve karıştırılır (Y. Üçcan, kişisel görüşme, 2018). Sitrik asit eklenmesinin amacı rengin matlaşmasının ve şeker kristalizasyonunun önlenmesidir (Karaman vd., 2004). Karışımın şeker çözünene kadar karıştırılması önemlidir, şekerin çökmesi ve yanması bu şekilde engellenir. Isıtma sırasında şekerin çözündürülmesi, karamelize edilmesi ve inversiyonu gerçekleşir (Karaman vd., 2004). Ayrıca ısıtma işlemi sırasında su kaybı meydana gelir ve şeker konsantre olur. Sıcak karamelize şeker çözeltisi daha sonra soğuk bir yüzeye dökülerek soğutulur ve ağartma işlemi yapılır. Ağartma işleminde şeker karışımı metal bir askıya asılarak elle veya makine ile gerilerek (çekme) katlanır ve tekrar gerilir. Bu işlem defalarca tekrarlanarak şeker karışımına hava girmesi sağlanır ve daha yumuşak ve beyaz bir şeker hamuru elde edilir. Ayrı bir tankta un ve tereyağı karıştırılarak kavrularak miena adı verilen bir hamur hazırlanır. Hazırlanan şeker hamuru ve miena dairesel olarak germe uygulanan bir makinede homojen hale gelene kadar 30 dakika karıştırma, germe ve katlama uygulanarak lifli yapı

kazandırılır (Karaman vd., 2004; Y. Üçcan, kişisel görüşme, 2018). Bu aşamadan sonra ürün kalıplanır ve preslenir. Kalıp halindeki saray helvası baklava şeklinde kesilerek ambalajlanır. Ambalaj olarak, saray helvasının özelliklerini koruyacak nitelikte kağıt, selofan ve mevzuata uygun plastik esaslı maddeler veya bunların kombinasyonları kullanılır (Karaman vd., 2004).

Genel olarak şekerlemeler düşük su aktivitesine sahip olmalarından dolayı diğer gıda ürünlerine göre daha dayanıklıdır ve daha uzun raf ömrüne sahiptirler. Ancak raf ömürleri yapısal bozulmalar nedeniyle kısıtlanmaktadır. Şekerlemelerin bileşimindeki yüksek şeker oranı, yapılarının proses sonrasında oluşmasında ve depolama sırasında bozulmasında kritik bir rol oynamaktadır. Yapıda bulunan diğer bileşenler de proses koşullarına bağlı olarak yapıya katkıda bulunabilirler. Şekerli ürünler bileşim, üretim yöntemi ve parametrelerine bağlı olarak camsı, kauçuğumsu veya kristal yapıya sahip olabilir. Ürün camsı halde berrak, sert veya gevrek yapıdayken, kauçuğumsu halde yapışkan ve nispeten yumuşak, kristal halde ise mat ve kırılğan bir yapı gösterir. Taze ürünün mevcut halinin korunması ürünün kalitesini ve raf ömrünü etkiler. Ürünün hal değiştirmesiyle depolama sırasında yapısal bozukluklar meydana gelmektedir (Bhandari ve Howes, 1999; Subramaniam, 2000). Kristal hal en düşük enerjiye sahip denge hali olduğundan camsı ve kauçuğumsu hal zamana bağlı olarak depolama koşullarına bağlı olmaksızın kendiliğinden kristal hale doğru bir dönüşüm gösterirler. Ürünün bileşimi, üretim koşulları, ambalajı ve depolama koşullarının kontrolü ile hal değişimlerini yavaşlatmak ve ürünü raf ömrü boyunca mevcut halinde ve yapısında tutmak mümkündür. Ayrıca camsı halden kauçuğumsu hale geçiş ile moleküler hareketlilik artar, başta fiziksel bozulmalar olmak üzere difüzyona bağlı tüm bozulmaların hızları artar. Oda sıcaklığında depolanan ürünlerde depolama sıcaklığı ve bağlı nemine ve ambalajın geçirgenliğine bağlı olarak ürünün nemi ve sıcaklığı değiştiğinde ürünün yapısı korunamayabilir ve bozulmalar hızlı gerçekleşebilir (Bhandari ve Howes, 1999; Subramaniam, 2000).

Şekerlemeler geleneksel ürünler olduğundan üretim ve depolama koşullarının ürün kalitesine etkileri kısmen bilinmekte, bu tip ürünlerin yapılarının oluşumu ve bozulmalarının bilimsel temelleri ve etkili faktörler daha sonra yapılan araştırmalarla ortaya koyulmaktadır. Bu araştırmalarda gıdanın bileşimi ve fiziksel halini gösteren hal grafiklerinin üretim ve depolama koşullarına uygulanması ile ürünlerdeki hal değişimleri belirlenmekte ve bu veriler ışığında ürünün kalitesinin yükseltilmesi ve raf ömrünün uzatılması için uygun yöntemler belirlenebilmektedir (Roos, 2010; Ergun vd., 2010; Hartel ve Nowakowski, 2017). Bu tip çalışmalar, gofret, sert şeker, yumuşak şeker, karamel ve pamuk şeker gibi ürünlerde yapılmıştır (Labuza ve Labuza, 2004; Payne ve Labuza, 2005; Ergun vd., 2010; Hartel vd., 2013; Mendenhall ve Hartel, 2014, 2016).

Şekerlemelerin depolanması sırasında meydana gelen sıcaklık ve nem değişiklikleri, başlıca yapı olmak üzere renk ve tatta değişime, kalitede kayıplara ve raf ömrünün kısalmasına sebep olmaktadır. Unlu şekerlemeler nem içeriklerinin düşük olması sebebiyle ortamdaki nem alma eğilimindedir. Sıcaklık artışı tüm bozulmaların hızını artıran önemli bir faktördür. Literatürde unlu şekerlemelerdeki bozulmalar ve etkili faktörler konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, unlu şekerlemelere model bir ürün olarak saray helvasında meydana gelen bozulmaları karakterize etmek ve depolama sıcaklık ve bağıl neminin bozulma reaksiyonlarına etkilerini belirlemektir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Saray helvası İzmit'te yerleşik bir firmadan taze olarak temin edilmiştir. Ürün bileşiminde %78.6 karbonhidrat (%49.0 sukroz), %14.7 yağ, %4.5 protein ve %0.3 kül bulunmaktadır.

Saray helvasının nem ve su aktivitesinin belirlenmesi

Taze saray helvasının nemi, homojenize edilmiş numune kullanılarak 70°C'de 80 mmHg basınçta vakumlu etüv yöntemine göre belirlenmiştir. Su aktivitesi homojenize edilmiş numunedeki dijital

higrometre cihazı (Protimeter, PLC, İngiltere) ile oda sıcaklığında ölçülmüştür.

Saray helvası örneklerinin depolanması

Sabit bağıl nemli ortamlar (%22-90) sızdırmaz kapaklı kavanozlar içinde aşırı doymuş tuz çözeltileri (CH_3COOK , MgCl_2 , K_2CO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaBr , NaCl , KCl ve BaCl_2) kullanılarak hazırlanmıştır (Labuza, 1984). Birer helva numunesi (~20 g, 35x30x20 mm) kavanozların içindeki ayaklı bir platforma yerleştirilmiş ve kapakları kapatılarak 25 ve 35°C'deki etüvlerde denge nemine ulaşıncaya kadar depolanmıştır. Mikrobiyal gelişimi engellemek amacıyla bağıl nemin %65'ten fazla olduğu kavanozlara iki damla toluen ilave edilmiştir. Örneklerin denge nemine erişip erişmediği iki günde bir yapılan tartımlarla kontrol edilmiştir. İki tartım arasındaki fark 2 mg/g kuru kütle değerinden düşük olduğu anda örneğin dengeye geldiği kabul edilmiştir (Labuza, 1984). Bağıl nemi en yüksek ortamda depolanan örneklerin denge nemine ulaşma süresi baz alınarak tüm örnekler 25°C'de 14 gün ve 35°C'de 18 gün depolanmıştır. Örneklerin denge nem içeriği, taze helvanın nem içeriği ve kazandıkları nemden hesaplanmış ve kuru bazda nem (%) olarak ifade edilmiştir. Denge nemine gelmiş örneklerde adsorpsiyon izotermelerinin belirlenmesi için su aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Örneklerdeki kalite değişimini belirlemek için doku, renk, oksidasyon ve X-ışını kırınımı analizleri yapılmıştır. Sabit bağıl nemli ortamlarda depolama denemeleri her seferinde taze numune kullanılarak üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Doku analizi

Saray helvasının sertliği tekstür cihazı (Texture Analyzer Plus, Lloyd Instruments, İngiltere) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümlerde 50 ve 100 N'luk yük hücreleri kullanılmıştır. Penetrasyon yöntemine göre ölçüm yapılmıştır (Bourne, 2002). Örneğin merkezine gelecek şekilde ayarlanmış 2 mm çaplı metal prob örneğe 5 mm derinliğe kadar batırılmış ve uygulanan kuvvet sertlik olarak belirlenmiştir.

Renk analizi

Saray helvasının renk ölçümleri renk ölçüm cihazı ile (Konica Chromameter CR-400, Minolta,

Japonya) gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonucu L^* , a^* ve b^* renk değerleri elde edilmiştir. L^* değeri parlaklığı, $+a^*$ değeri kırmızıyı, $-a^*$ değeri yeşili, $+b^*$ değeri sarıyı ve $-b^*$ değeri maviyi göstermektedir. Kalibrasyon için beyaz seramik tabla kullanılmıştır. Toplam renk değişimi (ΔE^*), taze saray helvasının değerleri referans alınıp Denklem 1'e göre saptanmıştır (Telis ve Martínez-Navarrete, 2009).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

Oksidasyon analizi

Saray helvası numunelerinde depolama süresince meydana gelen yağ oksidasyonu tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemi ile belirlenmiştir (Tarladgis vd., 1960). Bu yöntemle göre, distilasyon ile oksidasyon ürünü olan malondialdehit ayrılarak toplanmıştır. TBA'nın malondialdehitte verdiği reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renkteki bileşiğin konsantrasyonunun spektrofotometrik olarak saptanması ile oksidasyon düzeyi belirlenmiştir.

Analiz için homojenize edilmiş 30 g örnek, 97,5 mL distile su ve 2,5 mL 4 N HCl Kjeldahl tüplerine aktarılmıştır. Toplama kabında 50 mL distilat toplanıncaya kadar distilasyon işlemi sürdürülmüştür. Distilattan 10 mL deney tüpüne alınmış ve üzerine 5 mL 0,02 M TBA eklenip karıştırılmıştır. Tüp kaynar su banyosunda 35 dakika bekletilmiş ve ardından soğutulmuştur. Örneğin absorbanı spektrofotometrede 538 nm dalga boyunda okunmuştur. Ölçümler sonrası elde edilen absorban değerleri K sabiti ile çarpılıp 1000 g üründeki mg TBA ile reaksiyona giren madde (TBARS) olarak belirtilmiştir. K sabiti aşağıdaki denklem (2) kullanılarak hesaplanmıştır (Tarladgis vd., 1960).

$$K = \frac{72 \times 50 \text{ mL}}{7.4 \times \frac{10^7 \text{ mL}}{\text{mol}}} \times \frac{10^6}{\text{Örnek kütlesi (g)}} \times \frac{100}{\% \text{ Geri kazanım}} \quad (2)$$

Denklemdaki 72 malondialdehitin molar kütlesi ve 10^6 çevirme faktörüdür. Kalibrasyon eğrisi 1,1,3,3-tetraetoksipropan standart olarak kullanılarak oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinden molar absorpsiyon katsayısı 7.4×10^7 mL/mol.cm olarak bulunmuştur. Geri kazanımın

belirlenmesi için, ürün üzerine 10^{-8} mol standart içeren 5 mL standart çözelti eklenmiş ve metottaki işlemler uygulanmıştır. Metotta geri kazanım %73 olarak hesaplanmıştır. Bütün bu değerler denklemde yerine koyulduğunda K sabiti 2.22 olarak bulunmuştur.

X-ışını kırınımı (XRD)

Taze ve depolanan saray helvası numunelerinin fiziksel halini belirlemek için X-ışını cihazı (Miniflex, Rigaku, Japonya) kullanılmıştır. Örnek ezilip karıştırılarak homojen hale getirilmiş ve cihazın numune kabına doldurulmuştur. Örnek yüzeyi düzleştirildikten sonra X-ışını şiddeti, 5° - 50° 2-theta açısı aralığında $1^\circ/\text{dk}$ hız ile okunmuştur (Labuza ve Labuza, 2004). Ölçüm yapılırken kullanılan theta açısı X-ışınının örnek üzerine geliş açısıdır. Kristal yapılarda atom veya molekül dizilimine bağlı olarak belirli açı değerlerinde ışınlar kırılır ve bu açı değerleri grafiklerde pik olarak görünür. Camsı yapılarda ise belirli bir atom dizilimi olmadığı için her açıda kırınım gözlenir ama belirgin pikler bulunmaz. Ayrıca camsı yapılarda ölçülen X-ışını şiddeti kristal yapılara göre daha düşüktür. Üründeki hal değişimlerini sertlikteki değişimlerle ilişkilendirmek için sertlikte en çok değişim gözlenen bağıl nemlerde (%22-53) ölçüm yapılmıştır.

İstatistiksel analiz

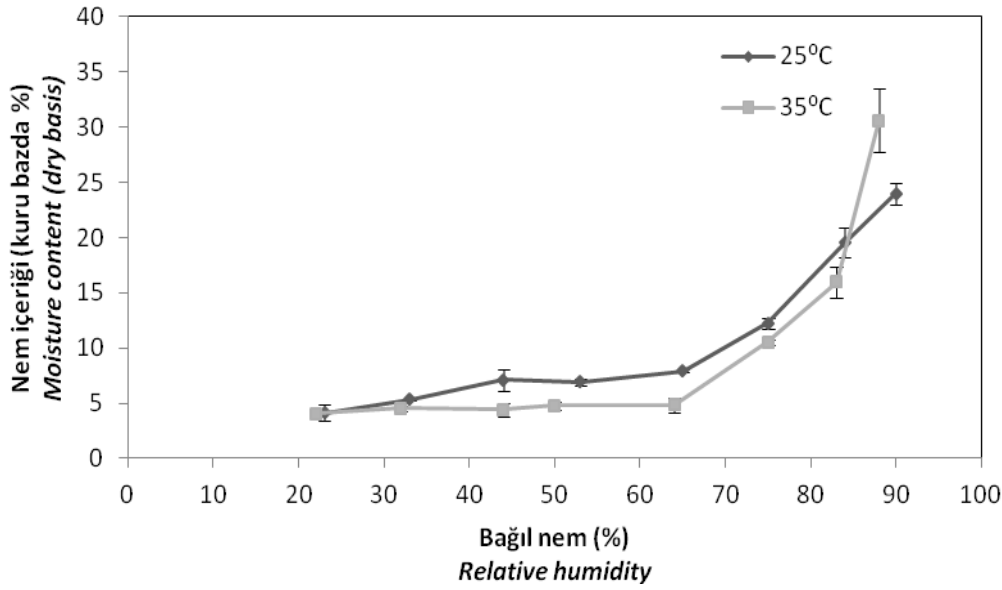
İstatistiksel analizler Minitab (Minitab Release 17.0, Minitab Ltd., Coventry, Birleşik Krallık) programı ile yapılmıştır. Her sıcaklıkta bağıl nemin örneğin kalite özelliklerine etkisinin belirlenmesi için 0,05 önem düzeyinde ($P < 0.05$) tek yönlü varyans analiz (ANOVA) yapılmış ve ortalamalar Tukey testi ile karşılaştırılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Taze saray helvasının nem içeriği yağ bazda %1.88 ve su aktivitesi 0.21 olarak ölçülmüştür. Saray helvasının adsorpsiyon izotermi Şekil 1'de gösterilmektedir. Saray helvası çözünür katılar ve polimerik bileşenler içeren gıdalarda gözlenen tipik sigmoid bir izoterm eğrisi göstermiştir (Mathlouthi ve Roge, 2003). Bu tip izoterm eğrisi çeşitli şekerli ürünler için de bildirilmiştir (Ergun vd., 2010). Bağıl nem %22-65 aralığında

değiştirildiğinde ürünün nem içeriği fazla değişmemiş, ancak %65'ten yüksek bağıl nemlerde önemli düzeyde artmıştır. Bu durumun kristal halde sukrozun bulunması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Katıların kristal halde iken suyu sadece yüzeyde hidrojen bağları ile bağlayabildiği ve bu nedenle su aktivitesinin düşük ve orta bağıl nemlerde fazla artmadığı, ancak yüksek bağıl nemlerde kristallerin yüzeyden çözünmeye başlaması ile su aktivitesinin önemli düzeyde arttığı bildirilmiştir (Ergun vd., 2010). Öte yandan

izotermeler kristal sukrozun izotermi ile tam olarak benzerlik göstermemektedirler. Kristal sukroz düşük ve orta bağıl nemlerde neredeyse sabit nem içeriğindedir, %80 bağıl nemde ise nem içeriğinde keskin bir artış göstermektedir, yani J harfi şeklindedir (Mathlouthi ve Roge, 2003). Bu durumun örneklerde bulunan nişasta ve gluten gibi polimerik bileşenlerden dolayı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1. Saray helvasının 25 ve 35°C'de elde edilen adsorpsiyon izotermeleri
Figure 1. Adsorption isotherms of palace halva at 25 and 35 °C

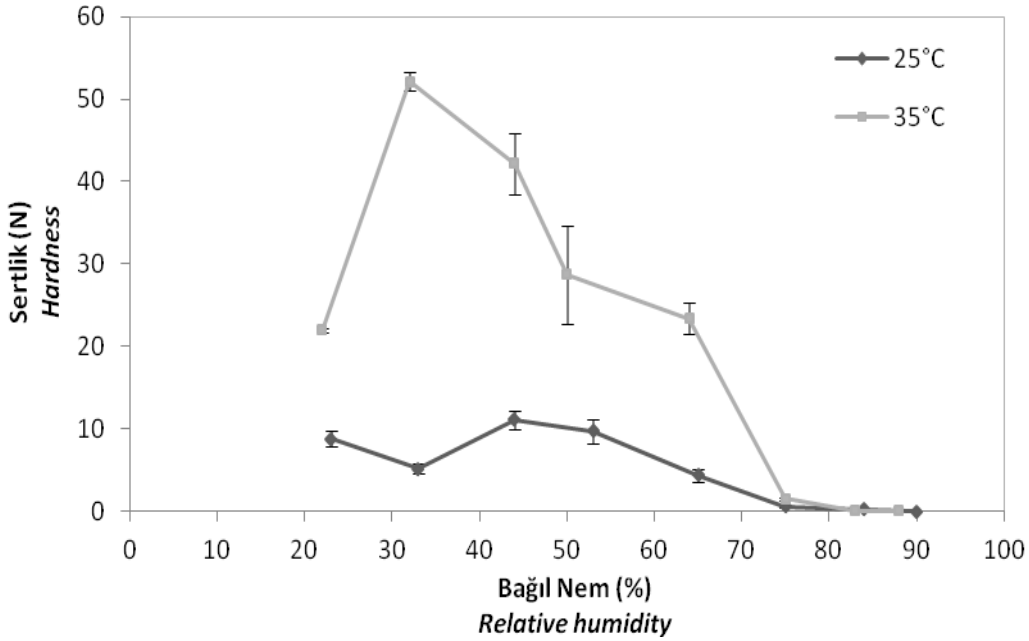
Saray helvasının denge nemine gelme süresi literatürde bildirilen sürelerle benzer bulunmuştur. Çikolatalı gevrek gofret tipi kurabiyelerde denge nemine gelme süresi 21 gün olarak bildirilmiştir (Payne ve Labuza, 2005). Örneklerin dengeye gelme süresi uzun olduğunda bazı bağıl nemlerde hal değişimi meydana gelebilmektedir. Bu durum, adsorpsiyon izotermelerinin kullanımında gözönünde bulundurulmalıdır. Örneklerin denge nemine gelmesi için gereken süre kısaltılarak bu durum önlenebilir. Bunun için örnek miktarı azaltılabilir ve örneğin dinamik koşullarda dengeye ulaşması sağlanabilir.

Dokusal değişimler

Taze saray helvasının depolama başlangıcında gevrek, kırılgan ve ağızda dağılan bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Saray helvasının depolama başlangıcında sertlik değeri 1.2 ± 0.13 N olarak belirlenmiştir. Her iki sıcaklıkta da nem içeriğindeki artışla birlikte, sertlikte önce artış daha sonra azalış gözlenmiştir (Şekil 2). En yüksek sertlik değeri 25°C'de %44 bağıl nemde, 35°C'de %32 bağıl nemde saptanmıştır. Depolama sıcaklığı 25°C olduğunda, %44 bağıl nemdeki örneğin sertliği %23 ve 53 bağıl nemdeki örneklerin sertliğine istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Yüksek bağıl nem değerlerinde (≥ 75) dengeye getirilen saray helvası

numunelerinin krema gibi kıvamlı akışkan bir yapı kazandığı ve yayıldığı gözlenmiştir. Bu bağıl nem değerlerinde örneğin sertliğinin taze ürünün sertliği ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak bağıl nemin artışı, ürünün yapısının taze ürünün yapısından çok farklı bir hale gelmesine

sebebin olmuştur. Sertlikte 25°C sıcaklıkta bağıl neme bağlı olarak meydana gelen değişimler Martínez-Navarete vd. (2004) tarafından gofret için bildirilen değişime benzer bulunmuştur.



Şekil 2: Saray helvasının 25 ve 35°C'de depolama sonrasında sertlik değerleri.

Figure 2. Hardness values of palace halva at 25 and 35 °C

Renk değişimi

Saray helvasının L*, a* ve b* değerleri üzerinde bağıl nemin ve sıcaklığın önemli düzeyde etkisinin olduğu saptanmıştır (Çizelge 1). L* değeri bağıl nem arttıkça azalmış, bu da örneklerin matlaştığını göstermiştir. Bağıl nem arttıkça a* değeri artmış yani ürünün kırmızılığı artmıştır. Sarılıktaki değişimi gösteren b* değeri ise %50-53 bağıl neme kadar bir artış göstermiş, daha sonra sabit kalmış ve %83-90 bağıl nemlerde ise azalmıştır. Ancak istatistiksel olarak 25°C'de %44-75 bağıl nemlerde, 35°C'de ise %22-64 bağıl nemlerde elde edilen b* değerleri benzer bulunmuştur.

Toplam renk değişimi incelendiğinde iki sıcaklık için de %64-65 bağıl nem değerlerine kadar hafif

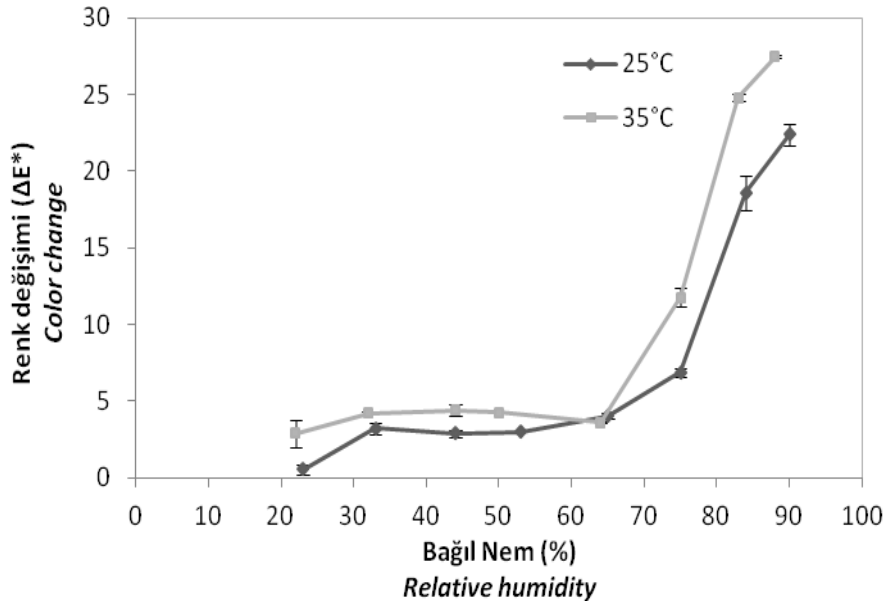
bir renk değişimi ve bu bağıl nemden daha yüksek bağıl nemlerde ise önemli düzeyde bir renk değişimi olduğu görülmektedir (Şekil 3). Saray helvasının bileşiminden dolayı Maillard esmerleşme reaksiyonunun renk değişimine sebep olduğu düşünülmektedir. Sherwin ve Labuza (2003) tarafından yapılan bir çalışmada 25°C'de depolanan model sistemlerde en yüksek esmerleşme reaksiyonu hızının 0.65-0.75 su aktivitesi değerlerinde görüldüğü bulunmuştur. Bu çalışmada da, esmerleşme reaksiyonu için optimum su aktivitesi değerlerinde renkteki değişim yüksek düzeyde meydana gelmiştir. Sıcaklık arttıkça reaksiyon hızı arttığı için 35°C'de meydana gelen renk değişimi 25°C'deki renk değişimine göre daha fazla olmuştur.

Çizelge 1. Saray helvasının 25 ve 35°C'de renk değerleri^{1,2}
 Table 1. Color values of palace halva at 25 and 35°C^{1,2}

25 °C				35 °C			
Bağıl nem (%) Relative humidity	L*	a*	b*	Bağıl nem (%) Relative humidity	L*	a*	b*
Kontrol Control	80.37±0.73 ^a	-0.46±0.05 ^a	14.84±0.28 ^a	Kontrol Control	80.37±0.73 ^a	-0.46±0.05 ^a	14.84±0.28 ^{ab}
23	80.32±1.35 ^a	-0.45±0.04 ^a	14.80±0.76 ^a	22	78.52±0.50 ^{ab}	-0.35±0.05 ^a	16.98±1.50 ^c
33	77.43±1.16 ^a	-0.35±0.05 ^a	16.15±0.19 ^{ab}	32	77.40±0.86 ^b	0.37±0.05 ^b	17.72±0.57 ^c
44	77.90±0.61 ^a	-0.32±0.02 ^a	16.34±0.67 ^b	44	77.24±0.24 ^b	0.83±0.14 ^c	17.64±0.44 ^c
53	77.89±1.02 ^a	0.24±0.09 ^b	17.26±0.20 ^b	50	77.81±0.84 ^{ab}	0.99±0.10 ^c	17.95±0.37 ^c
65	77.11±0.55 ^{ab}	0.37±0.05 ^b	17.06±0.48 ^b	64	78.76±1.39 ^{ab}	0.99±0.17 ^c	17.63±0.63 ^c
75	73.80±1.03 ^b	1.00±0.05 ^c	16.25±0.11 ^b	75	69.06±1.53 ^c	2.45±0.08 ^d	16.21±0.48 ^{ac}
84	61.96±2.18 ^c	1.13±0.23 ^c	12.90±0.33 ^c	83	55.93±1.05 ^d	3.44±0.24 ^e	13.23±0.75 ^b
90	58.25±1.60 ^d	1.19±0.07 ^c	11.90±0.29 ^c	88	53.27±0.84 ^d	3.84±0.10 ^f	13.77±0.22 ^b

¹ Ortalama ± standart sapma

² Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır ($P < 0.05$).

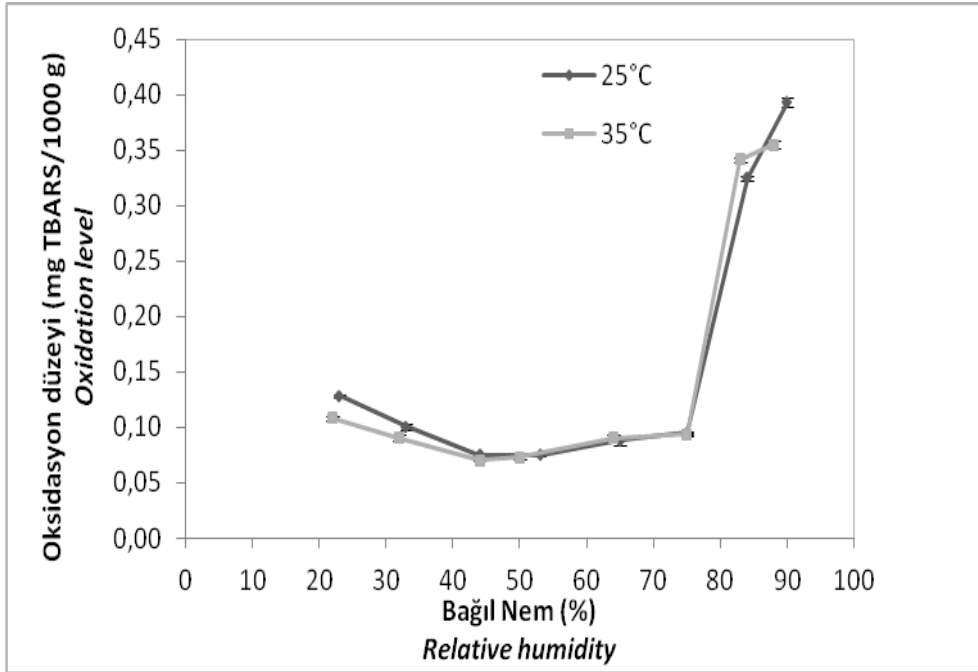


Şekil 3. Saray helvasında 25 ve 35°C'de depolama sonrasında renk değişimi
 Figure 3. Color change in palace halva after storage at 25 and 35°C

Oksidasyon

İçerdiği yağ ve su aktivitesi sebebiyle saray helvasında oksidasyon meydana gelmesi beklenmektedir. Saray helvası numunelerinde depolama sonrasında TBARS değerindeki değişimler Şekil 4'de gösterilmiştir. Taze saray helvasının 0.134 mg TBARS/1000 g değerine sahip olduğu bulunmuştur. Yağ oksidasyonu bağıl nem %44-53 aralığında olduğunda en düşük düzeyde gerçekleşirken, daha düşük ve yüksek bağıl nem koşullarında artış göstermiştir. Bu

durum oksidasyon-su aktivitesi ilişkisiyle uyumludur. Yağ oksidasyonunun hızı 0.4 su aktivitesi civarında minimum iken bu değerden düşük ve yüksek su aktivitelerinde artmaktadır. Düşük ve orta bağıl nemlerde yağın matris tarafından korunduğu söylenebilir. Ancak oksidasyon düzeyinin özellikle %75'ten yüksek bağıl nemlerde yüksek bir artış gösterdiği görülmektedir.



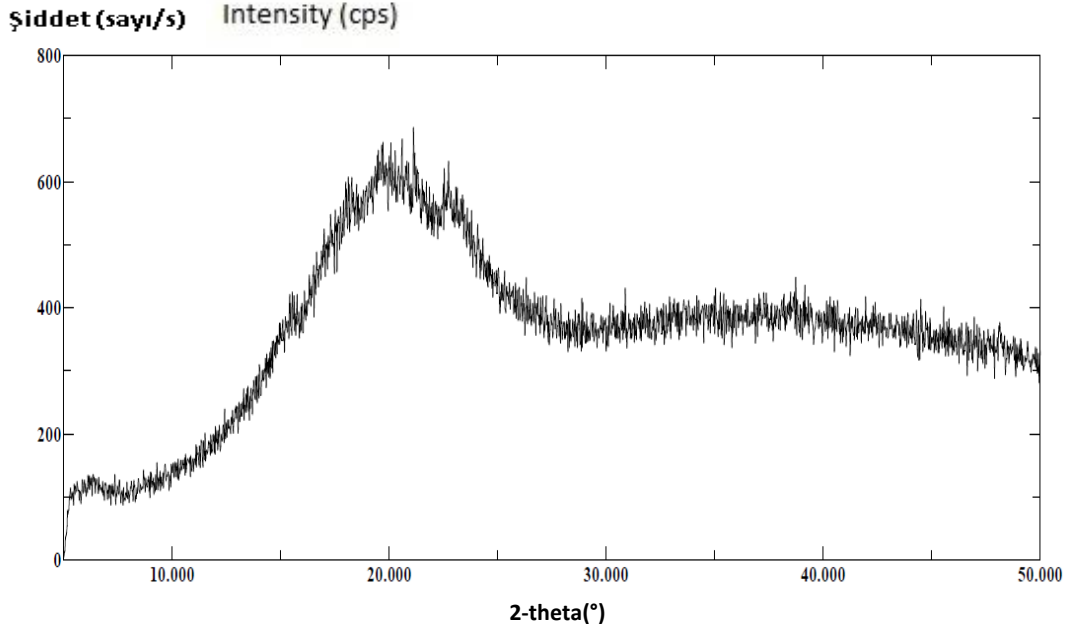
Şekil 4: Saray helvasında 25 ve 35°C'de depolama sonrasında oksidasyon düzeyi

Figure 4. Oxidation in palace halva after storage at 25 and 35 °C

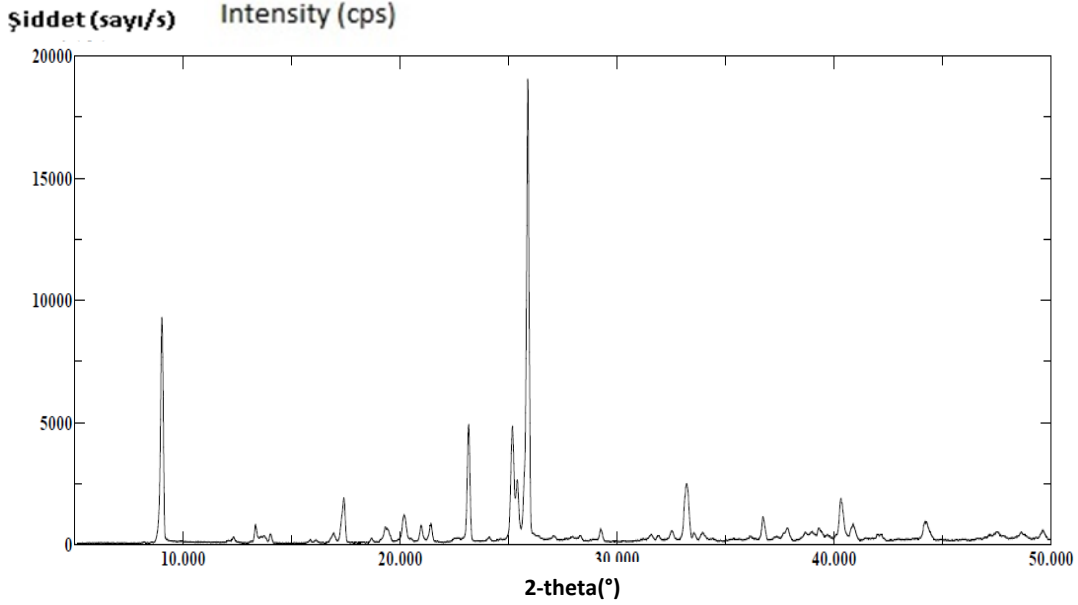
Yağ oksidasyonu sonucunda meydana gelen acılaşma bir gıda ürünüde kabul edilebilirliği olumsuz yönde etkiler. Yağ oksidasyonu hem düşük hem de yüksek su aktivitesinde gerçekleşebileceğinden üründeki nem değişimi kontrol altında tutulmalıdır (Labuza ve Hyman, 1998). Düşük su aktivitesine sahip olan saray helvası yağ oksidasyonu riski taşımaktadır ve yüksek nemli ortamda depolanmasıyla bu risk daha da artmaktadır.

Hal değişimi

X-ışını kırınımı ölçümlerinde, camsı yapıdaki maddelerin net pikler göstermeyip her açıda tepki vermesi, kristal yapıda ise maddeye bağlı olarak belirli açılarda net pikler vermesi beklenir. Taze saray helvasının X-ışını kırınımı grafiği Şekil 5'de gösterilmiştir. Bu grafiğe göre saray helvasının taze iken camsı halde olduğu belirlenmiştir. Saray helvasının temel bileşenlerinden olan ve hal değişimine sebep olan sukrozun kristal yapıdaki X-ışını kırınımı grafiği Şekil 6'da gösterilmiştir.



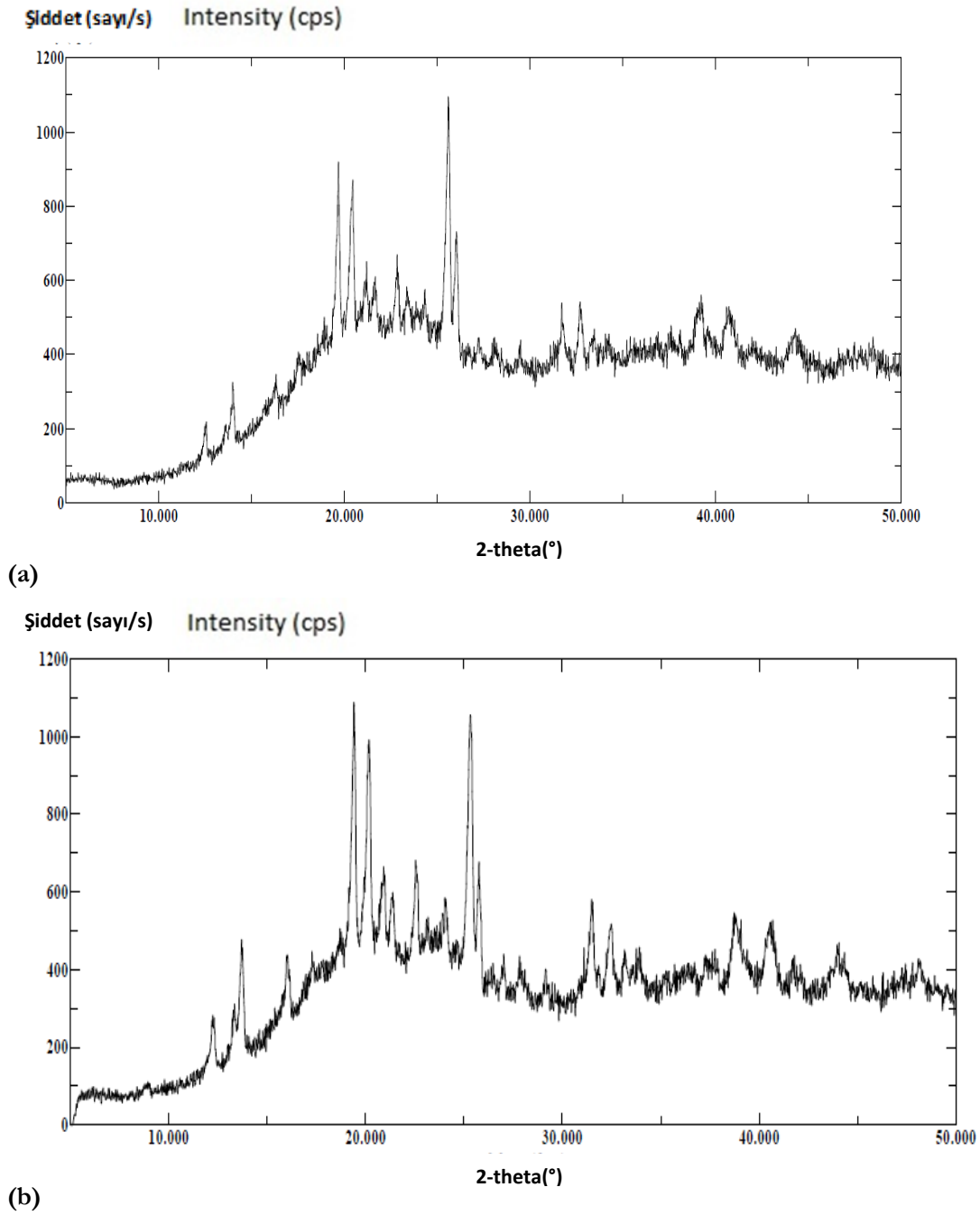
Şekil 5: Taze saray helvasının X-ışını kırınımı grafiği
Figure 5. X-ray diffraction profile of fresh palace halva



Şekil 6: Kristal sukrozun X-ışını kırınımı grafiği
Figure 6. X-ray diffraction profile of crystalline sucrose

Saray helvasında meydana gelen sertleşmenin sebebini açıklayabilmek için sertlikte en fazla değişim gözlenen bağıl nemlerdeki örneklerde X-ışını kırınımı ölçümleri yapılmıştır. Depolama sıcaklığı 25°C iken %23 ve 33 bağıl nemlerde camsı yapı ve %54 bağıl nemde kristal yapı

gözlenmiştir (Şekil 7a). Sıcaklık 35°C olduğunda ise, %22 bağıl nemde camsı yapı ve %32 ve 50 bağıl nemlerde kristal yapı saptanmıştır (Şekil 7b). Kristalize örneklerin X-ışını kırınımı grafiklerinde kristal sukrozun pik gösterdiği açılarda pikler görülmüştür.



Şekil 7: Kristalizasyon gözlenen sarayı helvası numunelerinin X-ışını kırınımı grafikleri, (a) 25°C-53%, (b) 35°C-%32.

Figure 7. X-ray diffraction profile of crystallized palace halva, (a) 25 °C-54%, (b) 35 °C-%32.

Elde edilen sonuçlara ve literatürde yayınlanan sukroz ve un bileşenleri gluten ve nişastanın hal grafiklerine dayanarak sarayı helvasında yapının oluşumu ve depolama sırasında değişimi açıklanabilir (Roos, 2010). Sarayı helvası

üretiminde ürün yapısı üç aşamada oluşturulmaktadır. Birinci aşamada şeker-su-sitrik asit karışımı 160-170°C'ye ısıtılmaktadır. Isıtma işleminde şeker çözündürülmekte ve konsantre edilmektedir. Aynı zamanda şeker karamelize

olmakta ve kısmi inversiyon meydana gelmektedir. Şeker çözündükten sonra karıştırma sonlandırılmakta, kaynama başlamakta ve kaynatma işlemi 160-170°C'de sonlandırılmaktadır. Bu işlem sırasında su kaybı olmakta ve şeker konsantrasyonunda artmaktadır. Sukrozun hal grafiğine bakıldığında kaynama sıcaklığı 170°C olduğunda nem içeriğinin %5'ten düşük olacağı tahmin edilmektedir (Hartel vd., 2011). Karışım bu durumda aşırı doymuş viskoz bir çözelti haldedir. Kaynatma sonrasında şeker çözeltisi soğuk bir yüzeye dökülerek hızla elle şekil verilebilecek bir sıcaklığa soğutulmaktadır. Nem içeriği %5'ten düşük olan şeker çözeltisinin oda sıcaklığının üstünde bir sıcaklıkta kauçuğumsu halde olacağı düşünülmektedir. Çözeltinin viskozitesi çok yüksektir, ancak germe (çekme) ve katlama işlemleri sırasında hava yapı içine girerek yapı yumuşamaktadır. Germe ve katlama işlemleri sırasında hem şeker kitlesi hem de hava kabarcıkları uzatılarak şeker ve hava katmanları oluşmakta ve sonuçta macun kıvamında bir yapı elde edilmektedir.

Üretimde ikinci aşamada, un ve tereyağı karışımı kavrulmaktadır. Kavurma işleminde ürünün sıcaklığının 100-140°C civarlarında olduğu varsayılabilir. Bu ısıtma işleminde ortamda, tereyağı ve undan gelen su bulunmakta ve karışımın yaklaşık %14 civarında bir nem içeriğine sahip olması beklenmektedir. Bu nem içeriği hem glutenin hidrasyonu hem de nişastanın jelatinizasyonu için yeterli değildir. Nişasta büyük oranda granül içinde kalacak ve proteinle etkileşime girmeyecektir (Kulp vd., 1991; Belcourt ve Labuza, 2007). Bu nedenle bu iki bileşen tarafından ağ yapısı oluşturulamayacağı ancak destekleyici dolgu maddeleri olarak yapıda yer alacakları düşünülmektedir (Kulp vd., 1991). Sıcaklık değişimlerine bağlı olarak nişasta ve gluten de hal değişimi gösterebilirler. Kavurma işlemi sonunda nemi azaltılmış bir un-tereyağı karışımı elde edilmektedir.

Üçüncü aşamada, macun kıvamındaki şeker hamuru ve kavrulmuş un-tereyağı karışımı sıcak bir yüzeyde birleştirilmekte ve germe ve katlama yapılarak uzamış şeker katmanları arasına un-yağ karışımı eklenmektedir. Bu işlem sırasında un ve

yağ, hava kabarcıkları ile de yer değiştirecektir. Ürün oda sıcaklığına soğutulurken yaklaşık %2 nem içeriğinde şeker camsı hale geçecektir. Bu şekilde camsı şeker, nişasta, gluten, yağ ve hava kabarcıklarından oluşan bir yapı oluşmaktadır. Hava kabarcıklarının protein ve yağ tarafından stabilize edilebildiği bildirilmiştir (Hartel ve Nowakowski, 2017). Undaki nişasta ve gluten ile yağ, şeker liflerini kaplayarak yapışmalarını engellemekte ve dış ortamdan koruyan bir bariyer görevi görmektedirler (Hartel ve Nowakowski, 2017).

Bir gıdanın Tg değeri nem içeriği arttıkça düşmekte ve içerdiği bileşenlerin molar kütlesi arttıkça yükselmektedir. Susuz sukrozun Tg değeri 62-70°C iken, %2.5 nem içeriğinde 60°C ve %5 nem içeriğinde 25°C olarak bildirilmiştir (Hartel vd., 2011; Kawai, 2018). Yüksek molekül ağırlıklı nişasta ve glutenin katkıları da düşünülecek olursa saray helvasının Tg değeri 60°C'den yüksek olacaktır (Payne ve Labuza, 2005). Ortamdan nem alımı sonucunda Tg değeri düşecek ve belirli bir kritik nem içeriğinde oda sıcaklığına ulaşacaktır. Bu durumda camsı/kauçuğumsu hal değişimi oda sıcaklığında meydana gelecektir. Kauçuğumsu halde yapışkanlık artacak şeker lifleri birleşerek yapının bütünleşmesine sebep olacaktır, bu durum bağıl nem artışına bağlı olarak saray helvasının sertliğinde görülen artışı açıklamaktadır. Nem, nişasta ve gluten tarafından da adsorbe edilerek iç yapışkanlığı arttıracak ve bu da sertlik artışına katkıda bulunacaktır. Kauçuğumsu halde moleküler hareketliliğin artması sonucunda başta şeker kristalizasyonu olmak üzere tüm bozulma reaksiyonlarının hızı artacaktır. Depolama sıcaklığı artırıldığında da tüm bozulma reaksiyonlarının hızı artacaktır. Kristalizasyonun başladığı bağıl nemlerde üründe maksimum sertlik gözlenmiş ve 35°C'deki sertlik değerleri 25°C'deki değerlerden daha yüksek bulunmuştur.

Maksimum sertliğin gözlemlendiği bağıl nemlerden daha yüksek bağıl nemlerde kristalizasyon daha yüksek düzeyde meydana gelmiş, buna bağlı olarak yapının bütünlüğünün azalması ve kırılabilirliğinin artması sonucunda sertlikte bir düşüş gözlenmiş olabilir. Ürünün %65 bağıl

nemde, nem içeriği sıcaklığa bağlı olarak %5-8 civarındadır, bu nem içeriğinde sukroz aşırı doymuş viskoz amorf çözelti yapıdadır (Hartel vd., 2011). Nem içeriği arttıkça sukroz konsantrasyonu azalacak ancak halen aşırı doymuş bir çözelti olacaktır. Çözelti konsantrasyonu azaldıkça yapışkanlığı ve viskozitesi de azalacak, artan moleküler hareketlilik sonucunda daha fazla kristalizasyon meydana gelecektir. Ancak aynı zamanda sukroz kristalleri nem içeriği arttıkça yüzeyden kısmen çözünmeye başlayacaktır. Bütün bu değişimler sonucunda %75 ve üzerindeki bağıl nemlerde ürünün iç yapışkanlığı azalmış, parçacıklı ve kendi ağırlığını taşıyamayan akışkan bir yapı ortaya çıkmıştır. Sıcaklık 35°C olduğunda, tereyağının erimesi de yapının yumuşamasına katkıda bulunmuştur.

Kristalizasyon hızının bağıl nemdeki artış ile birlikte arttığı bildirilmiştir. Sukrozun oda sıcaklığında %33.6 bağıl nemde depolandığında 2 gün sonra, %28.2 bağıl nemde ise 42 gün sonra kristalize olduğu, %11.8 bağıl nemde ise 800 gün sonra bile kristalize olmadığı bildirilmiştir (Makower ve Dye, 1956; Payne ve Labuza, 2005). Labuza ve Labuza (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, pamuk şekerin %0.05 nem içeriğinde ve %11 bağıl nemde 25°C'de 1 yıl kristalize olmadığı, %33 bağıl nemde ise 3 gün sonra yapının çöktüğü ve kauçuğumsu kristal, kumsu ve yapışkan bir yapı oluştuğu bildirilmiştir. Bu durum %33 bağıl nemde nem içeriğinin artışına bağlı olarak Tg değerinin oda sıcaklığının altına düşmesi ve kristalizasyonun meydana gelmesi ile açıklanmıştır. Gevrek kurabiyede yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Payne ve Labuza, 2005). Gevrek kurabiyede nem içeriği %6.44 ve su aktivitesi 0.44 olduğunda Tg değeri 13°C'ye düşmüş, oda sıcaklığında gevrekliğin kaybolduğu ve kristalizasyon meydana geldiği gözlenmiştir. Yumuşak kurabiyede, sukrozun Tg değerini ve sertlikteki değişimleri etkilediği bildirilmiştir (Kawai vd., 2014). Saray helvasında ise camsı yapı, 25°C'de %33 bağıl nemde denge nemine gelme süresi (14 gün) boyunca korunmuştur. Saray helvası bileşiminde bulunan ilave un ve yağdan dolayı pamuk şekere göre daha dayanıklı bir yapıya sahiptir. Un

bileşenleri Tg değerini yükseltirken, un ve yağ nem bariyeri olarak şekerin nem almasını geciktirebilirler. Ancak sıcaklık 35°C olduğunda, sıcaklık artışı ile viskozite azalmış, moleküler hareketlilik artmış ve %32 bağıl nemde kristalizasyon meydana gelmiştir. Viskozitenin azalmasında ve moleküler hareketliliğin artmasında tereyağının erimesinin de etkili olabileceği düşünülmektedir.

Gofrette yapılan bir çalışmada, %6-11 arasındaki nem içeriğinin ürünün camsı halde ve istenen gevreklikte olmasını sağlarken, bu aralığın altındaki nem içeriklerinde istenmeyen kırılğan camsı bir yapı, üzerindeki nem içeriklerinde ise ürünün kauçuğumsu halde olduğu bulunmuştur (Martinez-Navarrete vd., 2004). Gofrette camsı/kauçuğumsu hal değişimi için 20°C'deki kritik bağıl nem ve nem içeriği sırasıyla %59.1 ve %11.8 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada ise, saray helvasının 25°C'de %54 bağıl nem ve %6.9 nem içeriğinde kristal halde olduğu bulunmuştur. Sıcaklık 35°C olduğunda ise %33 bağıl nem ve %4.5 nem içeriği kristalizasyonun başlaması için yeterli olmuştur.

Bağıl nem arttıkça üründe esmerleşme ve oksidasyon artmış, özellikle bağıl nem %65 ve üzerinde olduğunda yüksek düzeyde renk değişimi ve oksidasyon meydana gelmiştir. Bu iki reaksiyonun su aktivitesi ile ilişkileri bilinmektedir. Buna ilaveten, camsı halde yapı içinde yağ oksijenden korunmuş ancak özellikle %75'ten yüksek bağıl nemlerde yapının dağılması, moleküler hareketliliğin artması ve yağın oksijene daha açık hale gelmesiyle reaksiyon hızı önemli düzeyde artmıştır (Hartel ve Nowakowski, 2017).

SONUÇ

Saray helvasının kalitesi, depolama sıcaklığı ve bağıl nemden önemli düzeyde etkilenmektedir. Ürünün yapısında sıcaklık ve bağıl nemden kaynaklanan dalgalanmalar sonucu oluşan değişimler üründeki bozulmaları da hızlandırmıştır. Ürünün sertliği %75'ten düşük bağıl nemlerde artarken, %75 ve üzerindeki bağıl nemlerde azalmıştır. Üründe bağıl nem artışına bağlı olarak oluşan Maillard reaksiyonu ürünün fildişi renginin mat ve kahverengiye dönüşmesine sebep olmuştur. Üründe %44-53 bağıl nemlerde

oksidasyon düzeyi minimumdur, bu değerlerin altındaki ve üstündeki bağıl nemlerde oksidasyonda artış saptanmıştır.

Saray helvasının bileşiminde bulunan yüksek orandaki şeker ürünün hal ve yapısında başlıca etkili bileşendir. Un ve yağ bileşenlerinin de yapının korunmasında ve değişiminde etkileri bulunmaktadır. X-ışını kırınımı ölçümleri ile saray helvasının taze iken camsı halde olduğu ve bağıl nem ve sıcaklık artışına bağlı olarak kristalize olabildiği belirlenmiştir. Üründeki bu hal değişimi kalitedeki değişimleri tetiklemiştir. Saray helvasının kalitesinin korunması için, depo sıcaklığı ve bağıl nemi kontrol altında tutulmalı, uygun bir ambalaj ile muhafaza yapılarak nem değişimi engellenmelidir. Bu çalışmada elde edilen veriler saray helvası ve benzer ürünlerin üretimi ve depolanması sırasında kalitenin korunması ve dayanıklılığın geliştirilmesinde kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 34426 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Belcourt, L.A., Labuza, T.P. (2007). Effect of raffinose on sucrose recrystallization and textural changes in soft cookies. *J Food Sci*, 72(1): C65-C71.

Bhandari, B.R., Howes, T. (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *J Food Eng*, 40(1-2): 71-79.

Bourne, M.C. 2002. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. 2nd ed. Academic Press, California, the USA, 423 p.

Ergun, R. Lietha, R. Hartel, R.W. (2010). Moisture and shelf life in sugar confections. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 50(2): 162-192.

Hartel, R.H., Ergun, R., Vogel, S. (2011). Phase/state transitions of confectionery sweeteners: Thermodynamic and kinetic aspects. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 10: 17-32.

Hartel, R.W., Labuza, K., Labuza, T.P., 2013. Shelf life of high-moisture confections: the case of the hardening marshmallow. *The Manufacturing Confectioner*, 93(3): 50-54.

Hartel, R.W., Nowakowski, C.M. (2017). Non-equilibrium states in confectionery. In: *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods*, Bhandari, B., Roos Y.H. (ed.), Woodhead Publishing, the UK, pp. 283-301.

Karaman, B., Tamer, C.E., Aydoğan, N., Çopur, Ö.U. (2004). Geleneksel gıdalarımızdan pişmaniye, cezerye ve pestil. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, 23-24 Eylül 2004, Van, Türkiye, 448 s.

Kawai, K. (2018). Glass transition properties and quality control of food. *J Food Eng*, 19(1): 9-14.

Kawai, K., Toh, M., Hagura, Y. (2014). Effect of sugar composition on the water sorption and softening properties of cookie. *Food Chem*, 145: 772-776.

Kulp, K., Olewnik, M., Lorenz, K., Collins, F. (1991). Starch functionality in cookie systems. *Starch*, 43(2): 53-57.

Labuza T.P. (1984). Moisture Sorption: Practical Aspects of Isotherm Measurement and Use. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, 150 p.

Labuza, T.P., Hyman, C.R. (1998). Moisture migration and control in multi-domain foods. *Trends Food Sci Technol*, 9(1): 47-55.

Labuza, T.P., Labuza, P.S. (2004). Influence of temperature and relative humidity on the physical states of cotton candy. *J Food Process Preserv*, 28(4): 274-287.

Makower, B., Dye, W.B. (1956). Equilibrium moisture content and crystallization of amorphous sucrose and glucose. *J Agric Food Chem*, 4: 72-77.

Martínez-Navarrete, N., Moraga, G., Talens, P., Chiralt, A. (2004). Water sorption and the plasticization effect in wafers. *Int J Food Sci Technol*, 39(5): 555-562.

Mathlouthi, M., Roge, B. (2003). Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders, *Food Chem*, 82: 402-417.

Mendenhall, H., Hartel, R.W. (2016). Protein content affects caramel processing and properties. *J Food Eng*, 186: 58-68.

- Mendenhall, H.N., Hartel, R.W. (2014). Control of caramel texture through formulation. *The Manufacturing Confectioner*, 94(1): 57-67.
- Payne, C.R., Labuza, T.P. (2005). Correlating perceived crispness intensity to physical changes in an amorphous snack food. *Drying Technol*, 23(4): 887-905.
- Roos, Y.H. (2010). Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annu Rev Food Sci Technol*, 1: 469-496.
- Sherwin, C.P., Labuza, T.P. (2003). Role of moisture in Maillard browning reaction rate in intermediate moisture foods: comparing solvent phase and matrix properties. *J Food Sci*, 68(2): 588-593.
- Subramaniam, P. (2000). Confectionery products. *The Stability and Shelf-Life of Food*, Kilcast, D. ve Subramaniam, P. (Ed.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 222-248.
- Tarladgis, B.G., Watts, B.M., Younathan, M.T. (1960). A Distillation Method for the Quantitative Determination of Malonaldehyde in Rancid Foods. *J Am Oil Chem Soc*, 37(1): 44-48.
- Telis, V.R.N., Martínez-Navarrete, N. (2009). Collapse and color changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition and addition of carbohydrate polymers. *Food Biophys*, 4(2): 83-93.
- TSE. (1992). TS 9999 Saray Helvası Standardı. Türk Standardları Enstitüsü, Ankara, Türkiye.

RAPID IDENTIFICATION OF SOME SWEETENERS AND SUGARS BY ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE-FOURIER TRANSFORM INFRARED (ATR-FTIR), NEAR-INFRARED (NIR) AND RAMAN SPECTROSCOPY

Burcu Guven^{1*}, Serap Durakli Velioglu², Ismail Hakki Boyaci¹

¹ Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Hacettepe University, Ankara, Turkey

² Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Tekirdag Namik Kemal University, Tekirdag, Turkey

Received/Geliş: 13.12.2018; Accepted/Kabul: 24.02.2019; Published online/Online baskı: 16.03.2019

Guven, B., Durakli-Velioglu, S., Boyaci, I.H. (2019). Rapid identification of some sweeteners and sugars by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR), near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy. *GIDA* (2019) 44 (2): 274-290 doi: 10.15237/gida.GD18119

Guven, B., Durakli-Velioglu, Boyaci, I.H. (2019). Rapid identification of some sweeteners and sugars by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR), near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy. *GIDA* (2019) 44 (2): 274-290 doi: 10.15237/gida.GD18119

ABSTRACT

The aim of the present study is to compare the vibrational characteristics of various sweeteners with different sugars by using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR), near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy. For this purpose, ATR-FTIR, NIR and Raman spectra of several sugars and sweeteners were recorded. The spectra of all samples were examined in detail for each technique. Then certain values of sugars (sucrose, galactose, fructose, glucose) and sweeteners (saccharin, sucralose, neotame, acesulfame K and rebaudioside A) were compared. Also, the spectra of binary, triple and quaternary mixtures of some sweeteners and sugars were analyzed. The specific bands of each of the sugars and sweeteners were identified. The obtained spectral information can be used as a reference to develop useful spectral methods for routine controls of sweeteners and sugars. Moreover, the methods will be helpful for the rapid identification of sweeteners and sugars.

Keywords: Sweeteners, sugars, ATR-FTIR spectroscopy, NIR spectroscopy, Raman spectroscopy

BAZI TATLANDIRICI VE ŞEKERLERİN ZAYIFLATILMIŞ TOPLAM YANSIMA-FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZILÖTESİ (ATR-FTIR), YAKIN KIZILÖTESİ (NIR) VE RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE HIZLI TANIMLANMASI

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, çeşitli tatlandırıcıların farklı şekerler ile titreşimsel özelliklerinin, zayıflatılmış toplam yansım-Fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR), yakın kızılötesi (NIR) ve Raman spektroskopisi yöntemleri kullanarak karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla; çeşitli şeker ve tatlandırıcıların ATR-FTIR, NIR ve Raman spektrumları kaydedilmiştir. Tüm örneklerin spektrumları her bir teknik için detaylı olarak incelenmiştir. Daha sonra şekerler (sakkaroz, galaktoz, fruktoz, glukoz) ve tatlandırıcılar (sakarın, sükraloz, neotam, asesülfam K ve rebaudioz A) için belirli değerlerin karşılaştırılması yapılmıştır. Ayrıca, bazı tatlandırıcılar ve şekerlerin ikili, üçlü ve dördü karışımlarının spektrumları analiz edilmiştir. Her bir şekerin ve tatlandırıcının spesifik bantları belirlenmiştir. Elde edilen spektral bilgi, tatlandırıcıların ve şekerlerin rutin kontrollerinde faydalı spektral yöntemlerin üretilmesi için referans olarak kullanılabilir. Ayrıca bu maddelerin hızlı bir şekilde tanımlanmasına da katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: Tatlandırıcılar, şekerler, ATR-FTIR spektroskopisi, NIR spektroskopisi, Raman spektroskopisi

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ burcuguven@hacettepe.edu.tr,

☎ (+90) 312 780 7100,

☎ (+90) 312 299 2123

INTRODUCTION

Sweetness in food is usually associated with sucrose, which is the most widely consumed sugar in the world. Because of many health problems associated with 'sugar' consumption, sweeteners are heavily used as sucrose substitutes in various food and beverages. Sweeteners and sugar alternatives in food technology include reduced calorie bulk sweeteners (maltitol, sorbitol etc.) and high intensity sweeteners (acesulfame K, aspartame and neotame, saccharin, sucralose etc.) (O'Donnell and Kearsley 2012). The permitted limit of sweeteners in food and/or beverages causes no safety problems. Nevertheless, it should be noted that synthetic sweeteners like all other purely synthetic food additives are xenobiotic substances which are foreign substances to humans. Therefore, the synthetic sweeteners are recommended to be used only when there is no alternative (Pussa 2008). There are some contradictory results in the literature regarding the safety of the synthetic sweeteners (Feehley and Nagler 2014; Mallikarjun and Sieburth 2015; Soffritti et al. 2014), and also negative consumer attitude towards them (Bearth et al. 2014). Hence, there is a growing interest in natural sweeteners, especially the natural high potency sweeteners.

Analysis and monitoring the content of sweeteners in food and beverage products using various methods (chromatographic, electrophoretic, and mass spectrometric methods, etc.) are also the subject of many studies in the literature (Dacome et al. 2005; Pane et al. 2015; Sakai et al. 2015). However, these current methods require the usage of expensive equipment, toxic chemicals and also long preparation steps. Hence, the analytical techniques enabling fast, sensitive and reliable discrimination, detection and analysis of sweeteners and/or sugars for routine control is of great importance. Spectroscopic techniques such as Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, near-infrared (NIR) and Raman have been widely and successfully used for the rapid and sensitive analysis and authentication of food in recent years (Buyukgoz et al. 2015; Lohumi et al. 2015). However, there are few studies reporting the usage of spectroscopic

techniques for detection of sweeteners (Buyukgoz et al. 2015; Jentzsch et al. 2016b; Peica 2009).

In literature, there are various techniques proposed for the analysis of sweeteners and sugars. Analysis of acesulfame K has been performed using capillary electrophoresis (CE), capillary zone electrophoresis (CZE) and high-performance liquid chromatography (HPLC) (Bergamo et al. 2011; Fernandes et al. 2013; Hannisdal 1992). Neotame has been analyzed using CZE, HPLC and nuclear magnetic resonance spectroscopy (Hu et al. 2013; Yang and Chen 2010; Zell et al. 2000). Sucralose has been detected using liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (LC/TOF-MS), high performance anion-exchange chromatography and CE (Ferrer and Thurman 2010; Hanco and Rohrer 2004; Stroka et al. 2003). LC/TOF-MS, CE, CZE and HPLC are also reported to be used in determination of saccharin (Bergamo et al. 2011; Fernandes et al. 2013; Ferrer and Thurman 2010; Hannisdal 1992). Analysis of rebaudioside A has been performed by using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and hydrogen/carbon, nuclear magnetic resonance techniques (Dacome et al. 2005; Jentzsch et al. 2016b). Sugars (glucose, fructose, galactose and sucrose) have been analyzed by HPLC, GC, GC-MS, LC/MS amperometric, CE, CZE techniques (Antiochia et al. 2004; Banos et al. 2000; Bernardes et al. 2004; Carvalho et al. 2003; Cheng et al. 2008; Hui et al. 2009; Kuhnle et al. 2008; Liu et al. 2006; Luo et al. 2012; Periasamy et al. 2011; Rovio et al. 2008). Nowadays, there is a growing interest in the usage of spectroscopic methods for detection and/or analysis of various sweeteners and sugars. In the study of Peica (Peica 2009), surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) was used for the identification and characterization of aspartame. Stability and solubility of it at various pH values were also determined in their study. Buyukgoz et al., (Buyukgoz et al. 2015) also used SERS with silver nanoparticles for the quantification of aspartame in soft drinks. Using characteristic aspartame band of the SERS spectra, the amount of aspartame in water was detected and quantified. In a more recent study by Jentzsch et al., (Jentzsch et al. 2016a), Raman spectroscopy

was also used for the detection of adulteration of stevia products with other sweeteners. In the study of Shim et al., (Shim et al. 2008) ATR-FTIR was used in the analysis of acesulfame K in diet food. There are also some examples of use of Raman or NIR spectroscopy in the analysis of sugars such as sucrose and glucose (İlaslan et al. 2014; Mabood et al. 2015; Silveira et al. 2009).

The aim of this study was to develop the spectra of various sugars (sucrose, galactose, fructose, glucose) and sweeteners (saccharin, sucralose, neotame, acesulfame K and rebaudioside A) to show the differences among them to be used in generation of spectral methods and identify the specific band assignments of sugars and sweeteners in mixtures by using spectroscopic methods which could make a significant contribution to the rapid discrimination of sweeteners and sugars, and their quantitative analyses for routine control.

MATERIAL AND METHOD

Materials

The materials in this study were the widely used sugars and sweeteners. Acesulfame K analytical standard was provided from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Neotame and sucralose standards were supplied from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). High purity (99.5%) D(+)glucose, D(+)galactose and D(-)fructose were provided from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sucrose was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All of the samples were kept in the dark at room temperature until analyzed.

The binary, triple and quaternary mixtures of various sweeteners and sugars were also prepared gravimetrically in equal amounts. Accordingly, rebaudioside A and neotame constituted the binary mixture. Two different triple mixtures were prepared, containing Acesulfame K, neotame and sucralose as the first, and acesulfame K, rebaudioside A and glucose as the second one. Mixture of saccharin, glucose, galactose and neotame were used as the quaternary mixture. The mixture samples were also analyzed and specific bands assignments were shown in ATR-FTIR, NIR and Raman spectra.

ATR-FTIR, NIR and Raman spectroscopy measurements

The ATR-FTIR spectra were measured using a Thermo Nicolet iS50 FTIR (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA) spectrometer equipped with a single bounce diamond crystal and a deuterated triglycine sulfate detector. The sweetener powders were placed on the crystal and thus the evanescent wave could be absorbed by the powder. The ATR-FTIR spectra of sweetener samples were determined to be in the range of 400-4000 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} . Each spectrum was collected from 32 scans in the absorbance mode.

NIR analysis was carried out using a Thermo Nicolet iS50 FTIR (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, MA) spectrometer with the smart diffuse reflectance accessory which maximizes the collection of diffusely scattered radiation, while minimizing the specular effect, resulting in the highest quality spectral result. The NIR spectra of sweetener samples were determined in the range of 4000-10000 cm^{-1} with a resolution of 8 cm^{-1} . Each spectrum was collected from 32 scans in the absorbance mode.

A DeltaNu Examiner Raman microscope (DeltaNu Inc., Laramie, WY) was used with a 785 nm laser source, motorized microscope with a stage sample holder and a CCD detector. The instrument parameters were as follows: 60 mW laser power and 60 s acquisition time. The spectra were obtained in the range of 200-2000 cm^{-1} . NuSpec™ spectra software was used for baseline correction of all Raman spectra. All measurements were performed at room temperature. Three measurements were averaged to produce one spectrum for each ATR, NIR and Raman measurements.

RESULTS AND DISCUSSION

ATR-FTIR characterization

ATR-FTIR spectra of samples were given in Fig. 1. The wavenumbers of the strongest bands were also given in Table 1 (Silverstein et al. 1981). As it can be seen from the Fig. 1, different characteristic bands were observed for all samples.

Table 1. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) bands of sweeteners and sugars.

Compound	ATR-FTIR bands (cm ⁻¹)
Acesulfame K	724(δ =C-H), 940(δ =C-H), 1173(stC-O, stC-N), 1290(stC-O, stC-N), 1589(stC=C)
Neotame	699(δ =C-H), 757(δ =C-H), 1540(stC=C), 1690(stC=O), 1728(stC=O), 2955(stO-H)
Sucralose	618(stC-Cl), 642(stC-Cl), 857(δ =C-H), 890(δ =C-H), 1001(stC-O), 1030(stC-O), 1092(stC-O), 3457(stO-H)
Saccharin	701(δ =C-H), 757(δ =C-H), 897(δ =C-H), 1175(stC-O, stC-N), 1332(stC-N), 1715(stC=O)
Rebaudioside A	888(δ =C-H), 988(δ =C-H), 1035(stC-O), 1066(stC-O), 1728(stC=O), 3356(stO-H)
Glucose	994(δ =C-H), 1019(stC-O), 1107(stC-O), 1146(stC-O), 3255(stO-H)
Fructose	781(δ =C-H), 976(δ =C-H), 1049(stC-O), 1147(stC-O), 3402(stO-H), 3521(stO-H)
Galactose	763(δ =C-H), 835(δ =C-H), 954(δ =C-H), 1043(stC-O), 3125(stO-H), 3200(stO-H), 3382(stO-H)
Sucrose	907(δ =C-H), 987(δ =C-H), 1049(stC-O), 1115(stC-O), 3327(stO-H)

δ =deformation, st=stretching

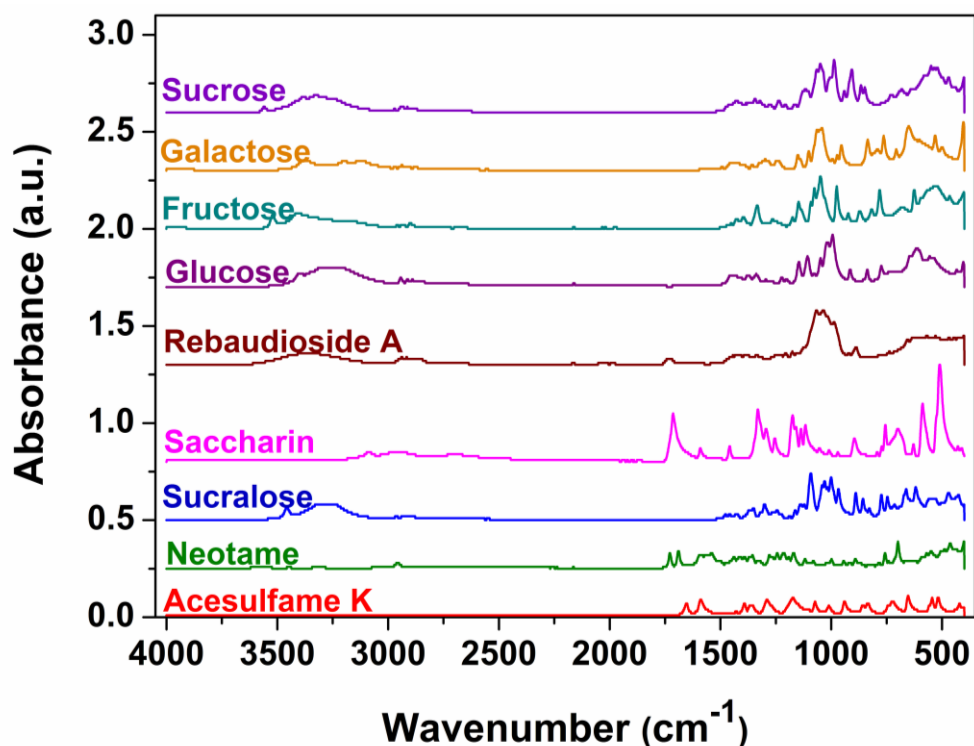


Fig. 1. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectra of sweeteners and sugars.

The strong intensity band of acesulfame K observed at 1173 cm^{-1} was attributed to stretching of C-O and C-N. Other significant bands with medium located around 1290 and 1589 cm^{-1} were assigned to stretching of C-O and C-N and stretching of C=C, respectively. The weak bands located around 724 and 940 cm^{-1} were assigned as deformation of C-H units.

The strong band of neotame located at 699 cm^{-1} was attributed to deformation of C-H. Other significant bands with medium intensity located around 757 , 1540 , 1690 and 1728 cm^{-1} were assigned to deformation of C-H, stretching of C=C, C=O and C=O, respectively. The weak band located at 2955 cm^{-1} was assigned as stretching of O-H.

The most intense band of sucralose located at 1092 cm^{-1} was assigned as stretching of C-O. Other significant bands with medium intensity located around 618 , 642 , 857 , 890 , 1001 and 1030 cm^{-1} were obtained. The bands observed at 618 and 642 cm^{-1} were assigned as stretching of C-Cl. The two bands observed at 857 and 890 cm^{-1} were assigned as deformation of C-H. The bands located at 1001 and 1030 cm^{-1} were both attributed to C-O stretching. The weak band located at 3457 cm^{-1} was assigned as stretching of O-H.

The sharp band of saccharin observed at 701 cm^{-1} was associated to a C-H deformation. Other bands with medium intensity located around 1175 , 1332 and 1715 cm^{-1} were found. The band observed at 1175 cm^{-1} was assigned as stretching of C-O and C-N. Another medium intensity band located at 1332 cm^{-1} was associated to a C-N stretching. The band located at 1715 cm^{-1} was attributed to stretching C=O. The weak bands located at 757 and 897 cm^{-1} were assigned as deformation of C-H units.

The strong intensity bands of rebaudioside A located at 1035 and 1066 cm^{-1} were attributed to stretching of C-O. The medium band of located around 988 cm^{-1} was assigned to deformation of C-H. Other bands of with weak located around 888 , 1728 and 3356 cm^{-1} were assigned to

deformation of C-H, stretching of C=O and stretching of O-H, respectively.

The strong bands of glucose observed around 994 and 1019 cm^{-1} were assigned to deformation of C-H and stretching of C-O, respectively. The medium intensity band located at 1107 cm^{-1} was attributed to stretching of C-O. The weak bands located at 1146 and 3255 cm^{-1} were associated to stretching of C-O and O-H, respectively.

The most intense band of fructose observed at 1049 cm^{-1} was attributed to stretching of C-O. The medium bands located around 781 and 976 cm^{-1} were both associated to C-H deformation units. The weak bands located around 1147 , 3402 and 3521 cm^{-1} were obtained. The band observed at 1147 cm^{-1} was assigned to stretching of C-O. The two bands observed at 3402 and 3521 cm^{-1} were attributed to stretching of O-H.

The sharp band of galactose located at 1043 cm^{-1} was assigned to stretching of C-O. Other significant bands with medium intensity located around 763 , 835 and 954 cm^{-1} were all associated to deformation of C-H. The weak bands located around 3125 , 3200 and 3382 cm^{-1} were all assigned to stretching of O-H.

The strong intensity of sucrose band located at 987 cm^{-1} was attributed to C-H deformation. The medium bands located around 907 and 1049 cm^{-1} were both assigned to C-H deformation. The weak bands located around 1115 and 3327 cm^{-1} were associated to stretching of C-O and O-H, respectively.

NIR characterization

NIR spectroscopy gives information about the overtones and combinations of fundamental vibrations. High vibrational frequencies of chemical bonds between light atoms, such as C-H, O-H, and N-H, result in overtone and combination bands which are detectable in region of $780\text{-}2500\text{ nm}$ (Osborne et al. 1993).

NIR spectra of samples are given in Fig. 2. The wavenumbers of the strongest bands are also given in Table 2 (Goddu and Delker 1960; Kaye

1954; Workman 2000). As it can be seen from Fig. 2, different characteristic bands were defined for all samples.

Table 2. Near-infrared (NIR) bands of sweeteners and sugars.

Compound	NIR bands (cm ⁻¹)
Acesulfame K	4028(CH combinations), 4321(CH, CH ₃ combinations), 4380(CH ₃ combinations), 4438(CH ₃ combinations), 5748(CH 1 st overtone), 5883(CH, CH ₃ 1 st overtone combinations), 6071(CH ₃ 1 st overtone).
Neotame	4039(CH combinations), 4438(CH ₃ combinations), 5197(CONH ₂ , RCO ₂ R ¹ 1 st overtone combinations), 6958(CH, ROH 2 nd overtone combinations).
Sucralose	4046(CH combinations), 4413(CH ₂ combinations), 5766(CH, CH ₂ 1 st overtone), 5848(CH, CH ₂ 1 st overtone combinations).
Saccharin	4130(CH combinations), 4427(CH ₃ combinations), 4680(RNH ₂ combinations), 6040(CH ₃ 1 st overtone), 8889(CH ₃ 2 nd overtone).
Rebaudioside A	4290(CH, CH ₂ , CH ₃ combinations), 4830(ROH combinations), 5211(RCO ₂ R ¹ 1 st overtone), 6983(CH, ROH 2 nd overtone).
Glucose	4219(CH, CH ₂ combinations), 4280(CH, CH ₂ combinations), 4388(CH ₂ combinations), 8345(CH, CH ₂ 2 nd overtone).
Fructose	4038(CH combinations), 4799(ROH combinations), 5833(CH, CH ₂ 1 st overtone combinations), 5944(CH, CH ₂ 1 st overtone combinations), 6831(ROH 2 nd overtone), 7287(CH ₂ 2 nd overtone), 8233(CH 2 nd overtone).
Galactose	4035(CH combinations), 4143(CH combinations), 4332 (CH, CH ₂ combinations), 4783(ROH combinations), 5774(CH ₂ 1 st overtone), 8360 (CH, CH ₂ 2 nd overtone combinations)
Sucrose	4313(CH, CH ₂ combinations), 4821(ROH combinations), 5914(CH, CH ₂ 1 st overtone combinations), 6960(CH, ROH 2 nd overtone combinations).

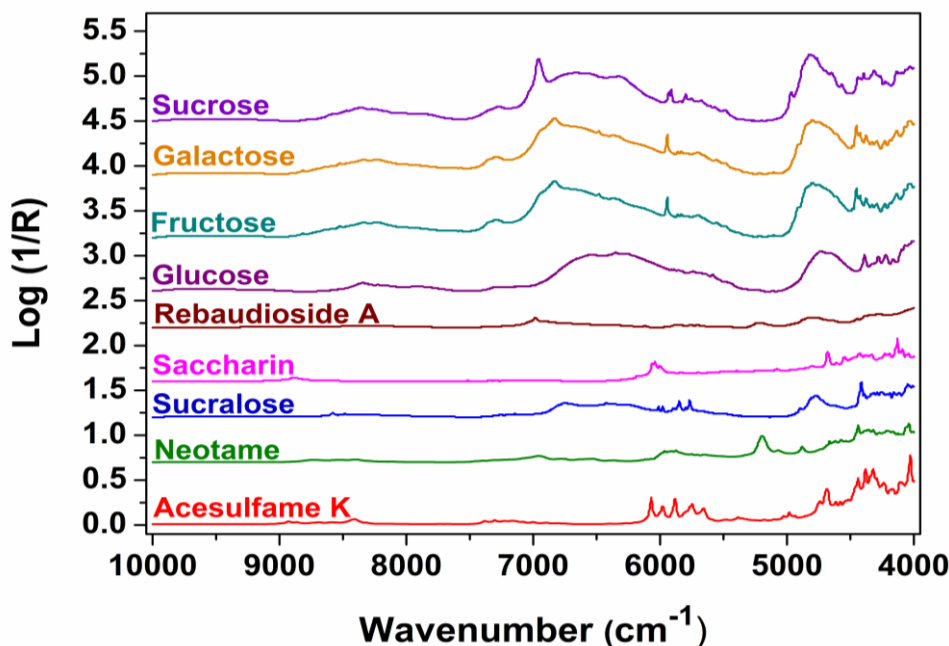


Fig. 2. Near-infrared (NIR) spectra of sweeteners and sugars.

The strong band of acesulfame K located at 4028 cm^{-1} was attributed to CH combinations. Other significant bands with medium intensity located around 4321 and 4380 cm^{-1} were obtained. The band observed at 4321 cm^{-1} was assigned to CH and CH_3 combinations. The band observed at 4380 cm^{-1} was associated to CH_3 combinations. The weak intensity bands around 4438 , 5748 , 5883 and 6071 cm^{-1} were obtained. The bands observed around 4438 and 5748 cm^{-1} were associated to CH_3 and CH 1st overtone combinations, respectively. The band observed at 5883 cm^{-1} was assigned to CH and CH_3 1st overtone combinations. The band located at 6071 cm^{-1} was assigned to CH_3 1st overtone.

The strong intensity bands of neotame observed around 4039 and 4438 cm^{-1} were attributed to CH and CH_3 combinations, respectively. The medium band located at 5197 cm^{-1} was associated to CONH_2 and RCO_2R^1 1st overtone combinations. The weak band located at 6958 cm^{-1} was assigned to CH and ROH 2nd overtone combinations.

The strong intensity band of sucralose observed at 4413 cm^{-1} was assigned to CH_2 combinations. The medium intensity band located at 4046 cm^{-1} was attributed to CH combinations. The weak bands located around 5766 and 5848 cm^{-1} were both assigned to CH and CH_2 1st overtone combinations.

The sharp intensity band of saccharin located at 4130 cm^{-1} was associated to CH combinations. Other significant bands with medium intensity located around 4427 , 4680 and 6040 cm^{-1} were attributed to CH_3 , RNH_2 and CH_3 1st overtone combinations. The weak band located at 8889 cm^{-1} was assigned to CH_3 2nd overtone.

The strong intensity band of rebaudioside A observed at 4290 cm^{-1} was attributed to CH, CH_2 and CH_3 combinations. The medium bands located around 4830 and 6983 cm^{-1} were obtained. The band observed at 4830 cm^{-1} was associated to ROH combinations. Another medium intensity band observed at 6983 cm^{-1} was associated to CH and ROH 2nd overtone

combinations. The weak intensity band located at 5211 cm^{-1} was assigned to RCO_2R^1 1st overtone.

The strong intensity bands of glucose located around 4219 , 4280 and 4388 cm^{-1} were attributed to CH and CH_2 combinations. The weak band located at 8345 cm^{-1} was associated to CH and CH_2 2nd overtone combinations.

The strong bands of fructose located around 4799 and 6831 cm^{-1} were assigned to ROH and ROH 2nd overtone combinations, respectively. The medium intensity bands located around 4038 and 5944 cm^{-1} were obtained. The band observed at 4038 cm^{-1} was associated to CH combinations. Another medium intensity band observed at 5944 cm^{-1} was associated to CH, CH_2 1st overtone combinations. The weak intensity bands located around 5833 , 7287 and 8233 cm^{-1} were attributed to CH, CH_2 1st, CH_2 2nd and CH 2nd overtone combinations.

The strong intensity bands of galactose observed around 4035 and 4783 cm^{-1} were associated to CH and ROH combinations. The medium bands located around 4143 , 4332 and 5774 cm^{-1} were obtained. The band observed at 4143 cm^{-1} was assigned to CH combinations. The band located at 4332 cm^{-1} was assigned to CH, CH_2 combinations. Another medium intensity band observed at 5774 cm^{-1} was assigned to CH_2 1st overtone. The weak band located at 8360 cm^{-1} was attributed to CH, CH_2 2nd overtone combinations.

The strong intensity bands of sucrose located around 4821 and 6960 cm^{-1} were obtained. The band observed at 4821 was associated to ROH combinations. Another strong band located at 6960 was associated to CH, ROH 2nd overtone combinations. The medium intensity located at 4313 cm^{-1} was assigned to CH, CH_2 combinations. The weak intensity located at 5914 cm^{-1} was attributed to CH, CH_2 1st overtone combinations.

Raman characterization

Raman spectroscopy presents detailed information about molecular vibrations which

depend on strength and types of chemical bonds (Zhu et al. 2011). Raman spectra of samples were given in Fig. 3. The wavenumbers of the strongest

bands were also given in Table 3 Anonymous, 2018; Torres 2007). Fig. 3 shows the different characteristic bands observed for the samples.

Table 3. Raman bands of sweeteners and sugars.

Compound	Raman bands (cm ⁻¹)
Acesulfame K	290(δ C-C _{aliphatic}), 350(δ C-C _{aliphatic} , δ C-CH ₃), 396(δ C-C _{aliphatic}), 547(δ C-C-O, δ C-CH ₃), 659(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 747(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}).
Neotame	263(δ C-C _{aliphatic}), 509(δ C-C-O, δ C-CH ₃), 620(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 759(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 946(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1003(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1018(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1207(δ C-H _{ring} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}).
Sucralose	353(δ C-C _{aliphatic} , δ C-O-C, δ C-C-H ₃), 536(δ C-C-O, δ C-CH ₃), 624(ν C-Cl, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 664(ν C-Cl, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 710(ν C-Cl, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 745(ν C-Cl, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 775(ν C-Cl, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}).
Saccharin	344(δ C-C _{aliphatic}), 384(δ C-C _{aliphatic}), 523(δ C-C-O), 704(ν C-S _{aliphatic} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 777(δ C-H, ν C-S _{aliphatic} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1018(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1179(δ C-H _{ring} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1595(ν C-C _{alicyclic,aliphatic} , ν C=C), 1698(ν C=C, ν C=O).
Rebaudioside A	355(δ C-C _{aliphatic} , δ C-O-C, δ C-CH ₃), 432(δ C-C-O), 739(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 897(ν C-C _{alicyclic,aliphatic} , ν C-O-C), 1123(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1203(δ C-H _{ring} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}).
Glucose	346(δ C-C _{aliphatic}), 406(δ C-C _{aliphatic}), 542(δ C-C-O, δ C-CH ₃), 841(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 915(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1074(ν C-O-C _{asym} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1121(ν C-O-C _{asym} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1345(δ C-H _{ring}).
Fructose	421(δ C-C-O), 525(δ C-C-O), 594(δ C-C-O), 627(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 818(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 872(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 926 (ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 978(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}) 1081(ν C-O-C _{asym} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}).
Galactose	358(δ C-C _{aliphatic} , δ C-O-C), 417(δ C-C _{aliphatic}), 532(δ C-C-O), 660(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 704(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 830(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 889(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1068(ν C-O-C _{asym} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1248(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}).
Sucrose	402(δ C-C _{aliphatic}), 525(δ C-C-O, δ C-CH ₃), 640(ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 850(ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 922 (ν C-O-C, ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1039(δ C-H _{ring} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}), 1124(ν C-O-C _{asym} , ν C-C _{alicyclic,aliphatic}).

δ =deformation, ν =vibration, t =torsion, st =stretching

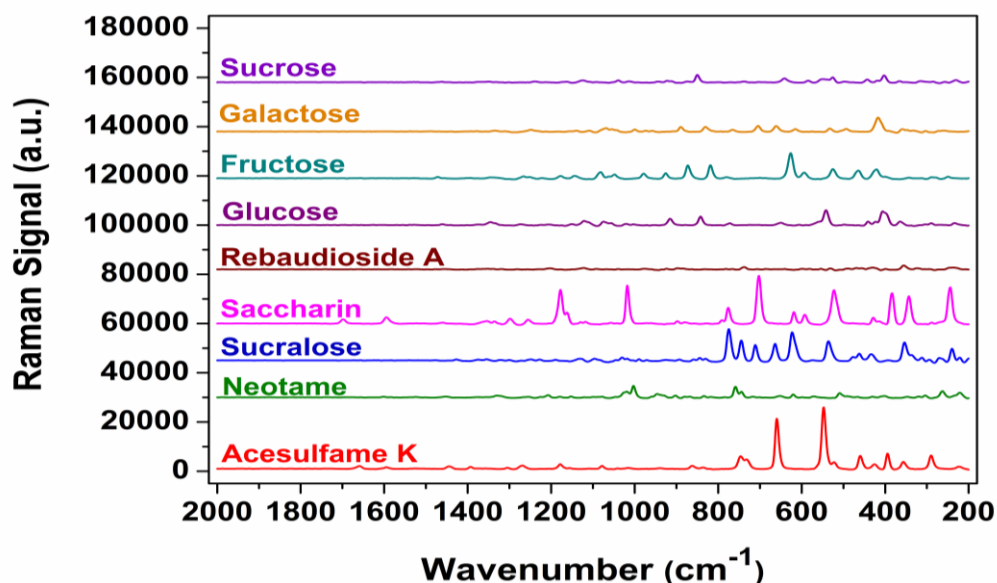


Fig. 3. Raman spectra of sweeteners and sugars.

The most intense bands of acesulfame K observed around 547 and 659 cm^{-1} were obtained. The band located at 547 cm^{-1} was assigned to deformation of C-C-O and C-CH₃. The band observed at 659 cm^{-1} was assigned to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. Other significant bands with medium intensity located around 290, 396 and 747 cm^{-1} were attributed to deformation of C-C_{aliphatic} and vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The weak band located at 350 cm^{-1} was associated to deformation of C-C_{aliphatic}.

The strong bands of neotame located around 759 and 1003 cm^{-1} were assigned to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. Medium intensity bands located around 263, 509, 946 and 1018 cm^{-1} were obtained. The bands observed around 263 and 1018 cm^{-1} were associated to deformation of C-C_{aliphatic} and vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The band located at 509 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C-O and C-CH₃. The band observed at 946 cm^{-1} was attributed to vibration of C-O-C and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The weak intensity bands located around 620 and 1207 cm^{-1} were assigned to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic} and deformation of C-H_{ring}.

The strong intensity bands of sucralose located around 624 and 775 cm^{-1} were both associated to

vibration of C-Cl and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The medium bands located around 353, 536, 664, 710 and 745 were obtained. The band observed at 353 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C_{aliphatic}, C-O-C and C-CH₃. The band observed at 536 cm^{-1} was assigned to deformation of C-C-O and C-CH₃. The bands located around 664, 710 and 745 cm^{-1} were associated to vibration of C-Cl and C-C_{alicyclic,aliphatic}.

The strong intensity band of saccharin observed at 704 cm^{-1} was attributed to vibration of C-S_{aliphatic} and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The medium intensity bands located around 344, 384, 523, 1018 and 1179 cm^{-1} were obtained. The two bands observed around 344 and 384 cm^{-1} were assigned to deformation of C-C_{aliphatic}. The band located at 523 cm^{-1} was assigned to deformation of C-C-O. Another medium intensity band located at 1018 cm^{-1} was associated to deformation of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The last medium intensity band observed at 1179 cm^{-1} was associated to deformation of C-H_{ring} and vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The weak intensity bands located around 777, 1595 and 1698 cm^{-1} were obtained. The band located at 777 cm^{-1} was attributed to vibrations of C-S_{aliphatic} and C-C_{alicyclic,aliphatic}. Another weak band observed at 1595 cm^{-1} was assigned to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic} and C=C.

The band observed at 1698 cm^{-1} was associated to vibration of C=C and C=O.

The sharp band of rebaudioside A observed at 355 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C_{aliphatic}, C-O-C and C-CH₃. Other significant bands with medium intensity located around 432 and 739 cm^{-1} were assigned to deformation of C-C-O and vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}, respectively. The weak intensity bands located around 897 , 1123 and 1203 cm^{-1} were obtained. The band observed at 897 cm^{-1} was associated to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic} and C-O-C. The band located at 1123 cm^{-1} was associated to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The band located at 1203 cm^{-1} was attributed to deformation of C-H_{ring} and vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}.

The strong intensity bands of glucose located around 406 and 542 cm^{-1} were assigned to deformation of C-C_{aliphatic} and C-C-O, respectively. The medium bands located around 841 and 915 cm^{-1} were both associated to vibration of C-O-C and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The weak intensity bands located around 346 , 1074 , 1121 and 1345 cm^{-1} were obtained. The band observed at 346 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C_{aliphatic}. The bands located around 1074 and 1121 cm^{-1} were both assigned to vibration of C-O-C_{asym} and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The band observed at 1345 cm^{-1} was assigned to deformation of C-H_{ring}.

The most intense bands of fructose located at 627 cm^{-1} was associated to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. Other significant bands with medium intensity located around 421 , 525 , 818 and 872 cm^{-1} were obtained. The band observed at 421 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C-O. The band located at 525 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C-O and C-CH₃. Another medium intensity bands observed around 818 and 872 cm^{-1} were both assigned to vibration of C-O-C and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The weak intensity bands located around 594 , 926 , 978 and 1081 cm^{-1} were obtained. The band observed at 594 cm^{-1} was associated to deformation of C-C-O. The band located at 926 cm^{-1} was associated to vibration of C-O-C and C-C_{alicyclic,aliphatic}. Another weak band located at 978 cm^{-1} was attributed to vibration of

C-C_{alicyclic,aliphatic}. The band observed at 1081 cm^{-1} was assigned to vibration of C-O-C_{asym} and C-C_{alicyclic,aliphatic}.

The sharp intensity band of galactose observed at 417 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C_{aliphatic}. The medium bands located around 660 , 704 , 830 , 889 and 1068 cm^{-1} were obtained. The bands observed around 660 and 704 cm^{-1} were both associated to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The bands located around 830 and 889 were both associated to vibration of C-O-C and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The band located at 1068 was assigned to vibration of C-O-C_{asym} and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The weak intensity bands located around 358 , 532 and 1248 cm^{-1} were obtained. The band located at 358 cm^{-1} was attributed to deformation of C-C_{aliphatic} and C-O-C. Another weak intensity band observed at 532 cm^{-1} was assigned to deformation of C-C-O. The band located at 1248 cm^{-1} was assigned to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}.

The strong bands of sucrose located around 402 and 850 cm^{-1} were obtained. The band observed at 402 cm^{-1} was associated to deformation of C-C_{aliphatic}. Another strong intensity band located at 850 cm^{-1} was associated to vibration of C-O-C and C-C_{alicyclic,aliphatic}. The medium intensity bands located around 525 and 640 cm^{-1} were obtained. The band located at 525 cm^{-1} was assigned to deformation of C-C-O and C-CH₃. Another medium intensity band observed at 640 cm^{-1} was assigned to vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The weak intensity bands were located around 922 , 1039 and 1124 cm^{-1} were obtained. The band located at 922 cm^{-1} was attributed to vibration of C-O-C and C-C_{alicyclic,aliphatic}. Another band observed at 1039 cm^{-1} was attributed to deformation of C-H_{ring} and vibration of C-C_{alicyclic,aliphatic}. The band observed at 1124 cm^{-1} was associated to vibration of C-O-C_{asym} and C-C_{alicyclic,aliphatic}.

The usage of spectral data of various sweeteners and sugars has great potential for the development of novel, fast, reliable and low cost methods for the simultaneous detection of these sweeteners and sugars. The obtained spectra in the present study could serve as reference for the interpretation of spectral studies of various food

and beverage products containing sugars and/or sweeteners. In order to show the applicability of these data, the analysis of binary, triple and quaternary mixtures were also performed and specific bands were identified. The spectra of the binary mixture of rebaudioside A and neotame, and specific bands assigned to ATR-FTIR, NIR and Raman spectra were given in Fig. 4. The

graphs of two different triple mixtures (acesulfame K, neotame and sucralose) and (acesulfame K, rebaudioside A and glucose) were given in Fig.5 and Fig. 6, respectively. In Fig. 7, the graphs of the quaternary mixture of saccharin, glucose, galactose and neotame and band assignments were seen.

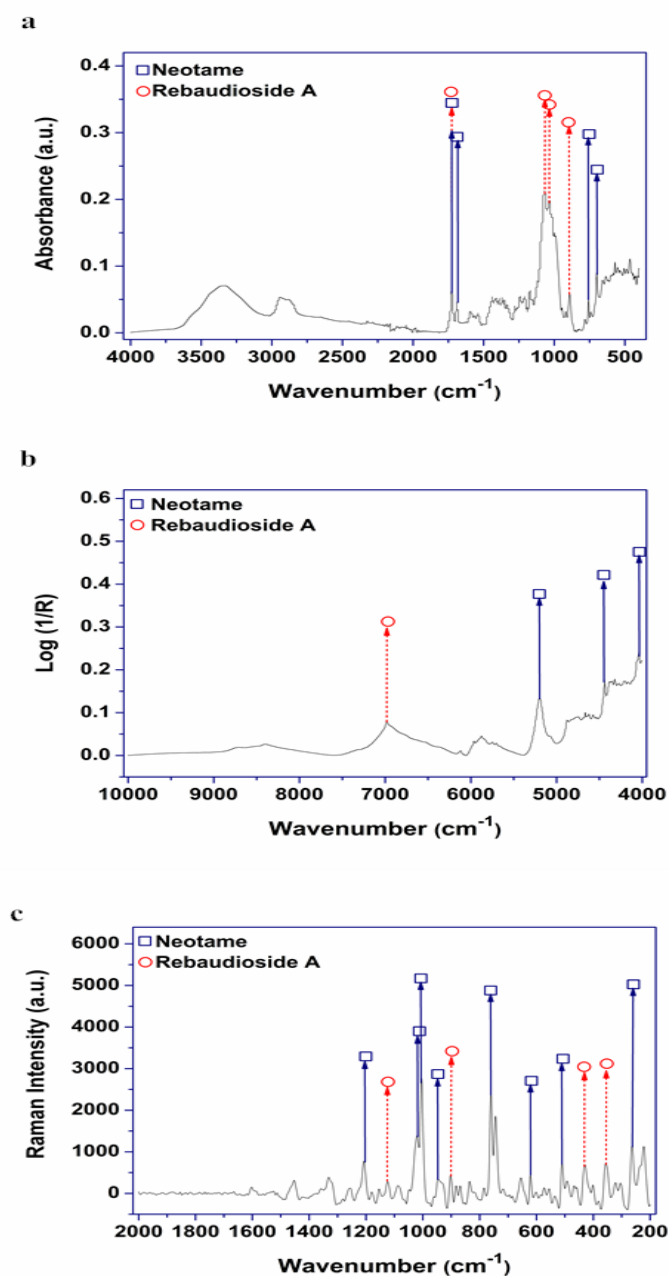


Fig. 4. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR), near-infrared (NIR) and Raman spectra of rebaudioside A and neotame mixture.

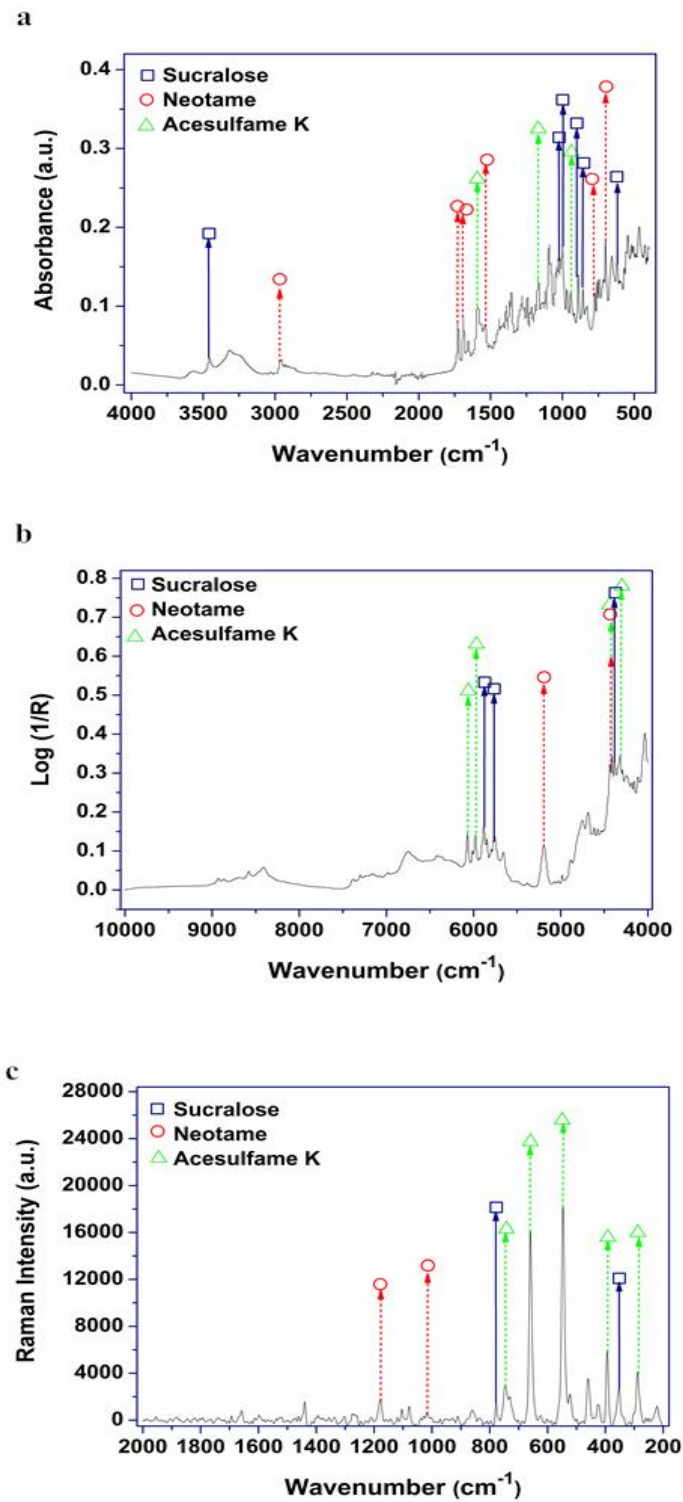


Fig. 5. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) (a), near-infrared (NIR) (b) and Raman (c) spectra of acesulfame K, neotame and sucralose mixture

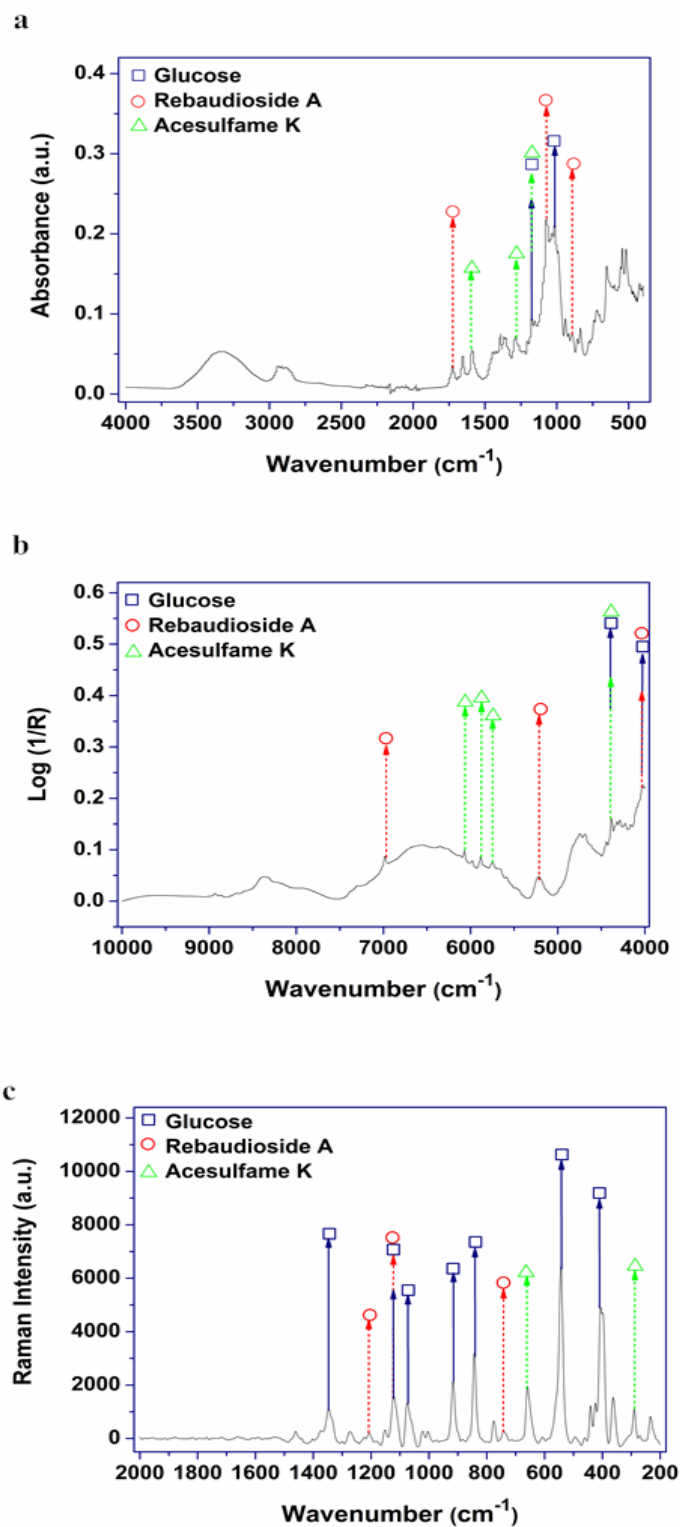


Fig. 6. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) (a), near-infrared NIR (b) and Raman (c) spectra of rebaudioside A, glucose and acesulfame K mixture.

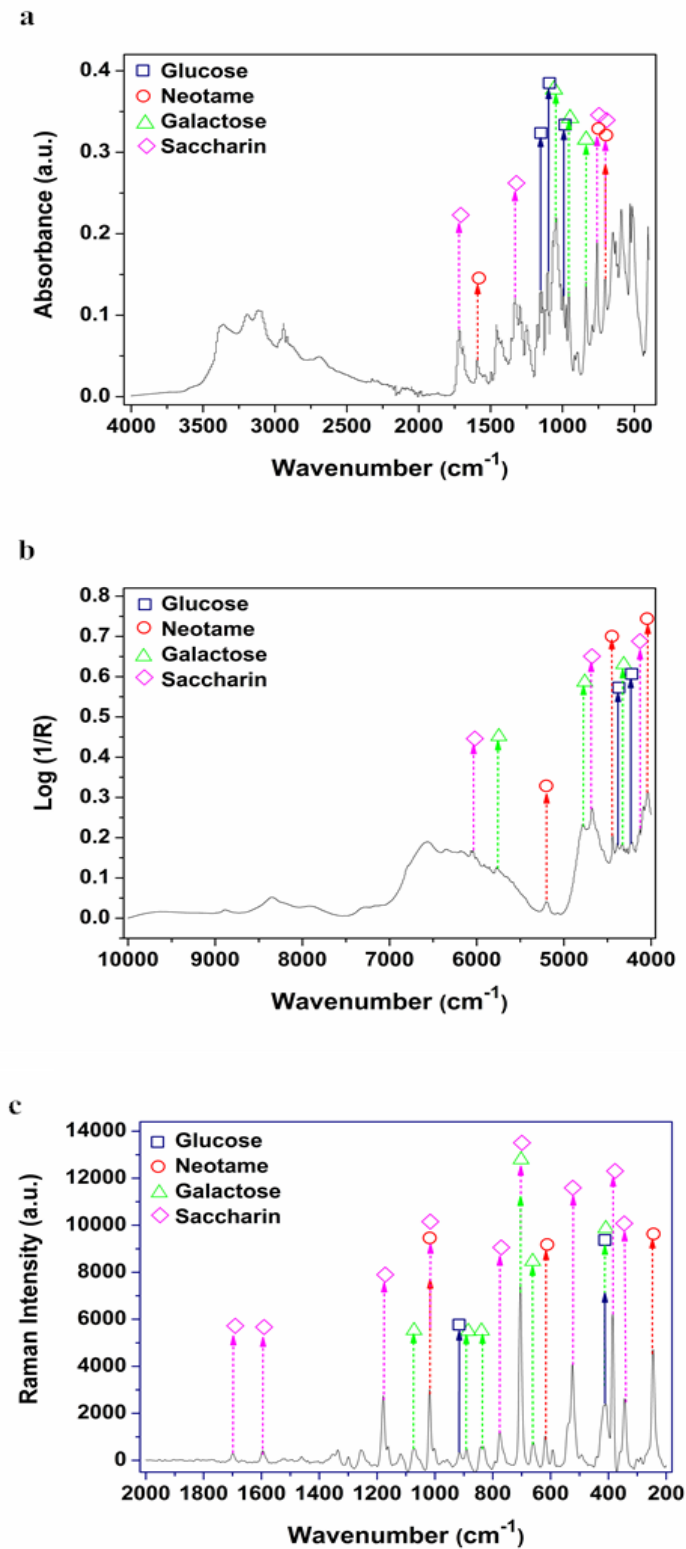


Fig. 7. Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) (a), near-infrared (NIR) (b) and Raman (c) spectra of saccharin, glucose, galactose and neotame mixture.

CONCLUSIONS

This study gives an overview of ATR-FTIR, NIR and Raman spectra of sugars and sweeteners. The spectral data of sugars and sweeteners were generated and the differences among them were shown. These data can be used as reference for further spectral investigations in food analysis and in development of spectral methods which can make a significant contribution to the rapid discrimination of sweeteners and sugars, and their quantitative analyses for routine control. The band assignments in ATR-FTIR, NIR and Raman spectra of the gravimetrically mixed samples also demonstrated that these spectra could be useful in development of the methods of identification of sweeteners present together with other sweeteners or sugars.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Anonymous, (2018). www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/Raman/bands.pdf (Accessed: 01 December 2018).
- Antiochia, R., Lavagnini, I., Magno, F., (2004). Amperometric mediated carbon nanotube paste biosensor for fructose determination. *Anal Lett*, 37(8): 1657-1669.
- Banos, J.L.G., Olano, A., Corzo, N., (2000). Determination of mono and disaccharide content of enteral formulations by gas chromatography. *Chromatographia*, 52(3-4): 221-224.
- Bearth, A., Cousin, M.E., Siegrist, M., (2014). The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. *Food Qual Prefer*, 38: 14-23.
- Bergamo, A.B., da Silva, J.A.F., de Jesus, D.P., (2011). Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chem*, 124(4): 1714-1717.
- Bernardez, M.M., Miguelez, J.D.M., Queijeiro, J.G., Queijeiro, J.G., (2004). HPLC determination of sugars in varieties of chestnut fruits from Galicia (Spain). *J Food Compos Anal*, 17(1): 63-67.
- Buyukgoz, G.G., Bozkurt, A.G., Akgul, N.B., Tamer, U., Boyaci, I.H., (2015). Spectroscopic detection of aspartame in soft drinks by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Eur Food Res Technol*, 240(3): 567-575.
- Carvalho, A.Z., da Silva, J.A.F., do Lago, C.L., (2003). Determination of mono- and disaccharides by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, 24(12-13): 2138-2143.
- Cheng, X., Zhang, S., Zhang, H.Y., Wang, Q.J., He, P.G., Fang, Y.Z., (2008). Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode. *Food Chem*, 106(2): 830-835.
- Dacome, A.S., da Silva, C.C., da Costa, C.E.M., Fontana, J.D., Adelman, J., da Costa, S.C., (2005). Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochem*, 40(11): 3587-3594.
- Feehley, T., Nagler, C.R., (2014). HEALTH The weighty costs of non-caloric sweeteners. *Nature*, 514(7521): 176-177.
- Fernandes, V.N.O., Fernandes, L.B., Vasconcellos, J.P., Jager, A.V., Tonin, F.G., de Oliveira, M.A.L., (2013). Simultaneous analysis of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K by CZE under UV detection. *Anal Methods-Uk*, 5(6): 1524-1532.
- Ferrer, I., Thurman, E.M., (2010). Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1217(25): 4127-4134.

- Goddu, R.F., Delker, D.A., (1960). Spectra-Structure Correlations for the near-Infrared Region. *Anal Chem*, 32(1): 140-141.
- Hanko, V.P., Rohrer, J.S., (2004). Determination of sucralose in splenda and a sugar-free beverage using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Agr Food Chem*, 52(14): 4375-4379.
- Hannisdal, A., (1992). Analysis of Acesulfame-K, Saccharin and Preservatives in Beverages and Jams by Hplc. *Z Lebensm Unters For*, 194(6): 517-519.
- Hu, F.L., Xu, L.N., Luan, F., Liu, H.T., Gao, Y., (2013). Determination of neotame in non-alcoholic beverage by capillary zone electrophoresis. *J Sci Food Agr*, 93(13): 3334-3338.
- Hui, H.X., Huang, D.S., McArthur, D., Nissen, N., Boros, L.G., Heaney, A.P., (2009). Direct Spectrophotometric Determination of Serum Fructose in Pancreatic Cancer Patients. *Pancreas*, 38(6): 706-712.
- Ilaslan, K., Boyaci, I.H., Topcu, A., (2014). Rapid Analysis of Glucose, Fructose and Sucrose Contents of Commercial Soft Drinks Using Raman Spectroscopy. *Food Control*(0).
- Jentzsch, P.V., Ciobota, V., Salinas, W., Kampe, B., Aponte, P.M., Rosch, P., Popp, J., Ramos, L.A., (2016a). Distinction of Ecuadorian varieties of fermented cocoa beans using Raman spectroscopy. *Food Chem*, 211: 274-280.
- Jentzsch, P.V., Torrico-Vallejos, S., Mendieta-Brito, S., Ramos, L.A., Ciobota, V., (2016b). Detection of counterfeit stevia products using a handheld Raman spectrometer. *Vib Spectrosc*, 83: 126-131.
- Kaye, W., (1954). Near-Infrared Spectroscopy - Spectral Identification and Analytical Applications. *Anal Chem*, 26(2): 428-428.
- Kuhnle, G.G.C., Joosen, A.M.C.P., Wood, T.R., Runswick, S.A., Griffin, J.L., Bingham, S.A., (2008). Detection and quantification of sucrose as dietary biomarker using gas chromatography and liquid chromatography with mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp*, 22(3): 279-282.
- Liu, Y.D., Ying, Y., Yu, H.Y., Fu, X.P., (2006). Comparison of the HPLC method and FT-NIR analysis for quantification of glucose, fructose, and sucrose in intact apple fruits. *J Agr Food Chem*, 54(8): 2810-2815.
- Lohumi, S., Lee, S., Lee, H., Cho, B.K., (2015). A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends Food Sci Tech*, 46(1): 85-98.
- Luo, L.Q., Zhu, L.M., Wang, Z.X., (2012). Nonenzymatic amperometric determination of glucose by CuO nanocubes-graphene nanocomposite modified electrode. *Bioelectrochemistry*, 88: 156-163.
- Mabood, F., Al-Harrasi, A., Bogue, R., Jabeen, F., Hussain, J., Hafidh, A., Hind, K., Ahmed, M.A.G., Manzoor, A., Hussain, H., Rehman, N.U., Iman, S.H., Said, J.J., Hamood, S.A., (2015). Determination of sucrose in date fruits (*Phoenix dactylifera L.*) growing in the Sultanate of Oman by NIR spectroscopy and multivariate calibration. *Spectrochim Acta A*, 150: 170-174.
- Mallikarjun, S., Sieburth, R.M., (2015). Aspartame and Risk of Cancer: A Meta-analytic Review. *Arch Environ Occup H*, 70(3): 133-141.
- O'Donnell, K., Kearsley, M.W., (2012). Sweeteners and sugar alternatives in food technology, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex, UK ; Ames, Iowa.
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.T., (1993). Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis, 2nd ed. Longman Scientific & Technical; Wiley.
- Pane, D.D., Dias, C.B., Meinhart, A.D., Ballus, C.A., Godoy, H.T., (2015). Evaluation of the sweetener content in diet/light/zero foods and drinks by HPLC-DAD. *J Food Sci Tech Mys*, 52(11): 6900-6913.
- Peica, N., (2009). Identification and characterisation of the E951 artificial food sweetener by vibrational spectroscopy and theoretical modelling. *J Raman Spectrosc*, 40(12): 2144-2154.
- Periasamy, A.P., Chang, Y.J., Chen, S.M., (2011). Amperometric glucose sensor based on glucose

- oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry*, 80(2): 114-120.
- Pussa, T., (2008). Principles of Food Toxicology. CRC Press
- Rovio, S., Simolin, H., Koljonen, K., Siren, H., (2008). Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*, 1185(1): 139-144.
- Sakai, H., Yamashita, A., Tamura, M., Uyama, A., Mochizuki, N., (2015). Simultaneous determination of sweeteners in beverages by LC-MS/MS. *Food Addit Contam A*, 32(6): 808-816.
- Shim, J.Y., Cho, I.K., Khurana, H.K., Li, Q.X., Jun, S., (2008). Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy coupled with multivariate analysis for measurement of acesulfame-K in diet food. *J Food Sci*, 73(5): C426-C431.
- Silveira, L., Moreira, L.M., Conceicao, V.G.B., Casalechi, H.L., Munoz, I.S., da Silva, F.F., Silva, M.A.S.R., de Souza, R.A., Pacheco, M.T.T., (2009). Determination of sucrose concentration in lemon-type soft drinks by dispersive Raman spectroscopy. *Spectrosc-Int J*, 23(3-4): 217-226.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C., (1981). Spectrometric Identification of Organic Compounds. John Wiley and Sons, New York.
- Soffritti, M., Padovani, M., Tibaldi, E., Falcioni, L., Manservigi, F., Belpoggi, F., (2014). Effects of Aspartame: The Urgent Need for Regulatory Re-Evaluation. *Am J Ind Med*, 57(4): 383-397.
- Stroka, J., Dossi, N., Anklam, E., (2003). Determination of the artificial sweetener Sucralose (R) by capillary electrophoresis. *Food Addit Contam*, 20(6): 524-527.
- Torres, M.G., Fernández, N.G., del Toro, P.O., Paneque, M.R., (2007). Raman spectroscopy of poly (3-hydroxybutyrate) modified with poly (vinyl acetate) by radiation-induced copolymerisation. *Nucleus*, 42: 41-45.
- Workman, J., (2000). Handbook of Organic Compounds: NIR, IR, Raman, and UV-Vis Spectra Featuring Polymers and Surfactants. Academic Press.
- Yang, D.J., Chen, B., (2010). Determination of neotame in beverages, cakes and preserved fruits by column-switching high-performance liquid chromatography. *Food Addit Contam A*, 27(9): 1221-1225.
- Zell, M.T., Padden, B.E., Grant, D.J.W., Schroeder, S.A., Wachholder, K.L., Prakash, I., Munson, E.J., (2000). Investigation of polymorphism in aspartame and neotame using solid-state NMR spectroscopy. *Tetrahedron*, 56(36): 6603-6616.
- Zhu, G.Y., Zhu, X., Fan, Q., Wan, X.L., (2011). Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. *Spectrochim Acta A*, 78(3): 1187-1195.



YER FISTIĞI KABUĞUNDAN BİYOETANOL ÜRETİMİ

Cihan Bostancı, Sevgi Ertuğrul Karatay, Gönül Dönmez*

Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü Ankara, Türkiye

Geliş / Received: 31.08.2018; Kabul / Accepted: 03.03.2019; Online baskı / Published online: 19.03.2019

Bostancı, C., Ertuğrul Karatay, S., Dönmez, G. (2019). Yer fıstığı kabuğundan biyoetanol üretimi. GIDA (2019) 44 (2): 291-300 doi: 10.15237/gida.GD18091

Bostancı, C., Ertuğrul Karatay, S., Dönmez, G. (2019). Bioethanol production from peanut shell. GIDA (2019) 44 (2): 291-300 doi: 10.15237/gida.GD18091

ÖZ

İkinci nesil biyoyakıtların önemi her geçen gün artmaktadır. Yer fıstığı ülkemizde bol miktarda yetişen bir tarım ürünüdür. Lignoselülozik bir tarımsal atık olan yer fıstığı kabuğu ikinci nesil biyoyakıt üretiminde biyokütle olarak kullanılabilir. Yapılan deneylerde, üretilen biyoetanolü optimize etmek amacıyla farklı kabuk konsantrasyonları, hidroliz koşulları, Accellerase 1500 enzim kullanımı, inkübasyon koşulları, inokülasyon oranı ve farklı azot kaynakları denenmiştir. Denemeler sonucunda, enzimatik hidrolizle %10 kabuk ve 1 g/L soya unu ile hazırlanan besiyerlerinde, 12 saatte, aerobik koşullarda ve maya optik yoğunluğu 0.86 olduğunda etanol üretiminin 2.24 g/L olduğu belirlenmiştir. İnokülasyon oranı ve inkübasyon süresi arttığında maya gelişimi OD₆₀₀: 6.0'a kadar yükselmiş ancak etanol üretimi düşmüştür.

Anahtar kelimeler: Yer fıstığı kabuğu, biyoetanol, yenilenebilir enerji, biyokütle.

BIOETHANOL PRODUCTION FROM PEANUT SHELL

ABSTRACT

The importance of second generation biofuels is increasing day by day. Peanut is an agricultural product that is abundantly produced in Turkey. Peanut shell which is a lignocellulosic agricultural biomass may be used to produce biofuel. In experiments to optimise bioethanol production, different shell loading concentrations, pretreatment conditions, the usage of Accellerase 1500 enzyme, incubation conditions, inoculation ratios and different nitrogen source were studied. In the media preparing with peanut shell sugar, obtaining after enzymatic hydrolysis, the bioethanol concentration and yeast growth was obtained as 2.24 g/L and 0.86 (OD₆₀₀) in the presence of 10% shell loading and 1 g/L soy flour at the end of 12 hours incubation time in aerobic conditions. Higher yeast growth such as 6.0 (OD₆₀₀), lower bioethanol production were obtained when the inoculation ratio and incubation times were increased.

Keywords: Peanut shell, bioethanol, renewable energy, biomass.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gdonmez@ankara.edu.tr

☎ (+90) 312 212 6720/ 1137

☎ (+90) 312 223 2395

GİRİŞ

Fosil yakıtların tükenmeye başlaması ve artan karbon emisyonu biyoetanole olan ilgiyi arttırmıştır (Martín ve Thomsen, 2007). Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere birçok ülkede, etanol-yakıt karışımları araçlarda kullanılmaktadır. Karbon emisyonunu azaltmak amacıyla ülkemizin de imzaladığı Kyoto Protokolü gereğince ülkemizde de benzin-etanol karışımı kullanımının önü açılmıştır. Enerji Piyasası Düzenleme Kurumu (EPDK) tarafından 07.07.2012 tarih ve 28346 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan tebliği uyarınca 01.01.2014 tarihinden itibaren benzine en az %3 (v/v) oranında yerli tarım ürünlerinden üretilmiş etanolün harmanlanması zorunlu kılınmıştır.

Dünyanın biyoetanol üretimindeki en büyük iki ismi olan Amerika Birleşik Devletleri ve Brezilya'da etanol üretmek için kullanılan temel kaynaklar şeker ve mısır nişastasıdır (Rouhollah vd., 2007; Soccol vd., 2010). Birincil nesil olarak adlandırılan bu biyoyakıtların en büyük dezavantajları yiyeceklerle olan rekabetleridir. Artan dünya nüfusunun gıda kaynaklarına olan talebi arttırması, ikincil nesil biyoyakıtlar olarak adlandırılan lignoselülozik tarımsal atıkların biyoetanol eldesinde kullanımını cazip hale getirmiştir (Sarkar vd., 2012; Zayed vd., 2017).

İkinci nesil biyoyakıtlar ve özellikle lignoselülozik biyoetanol üretimi, fosil yakıtlardan türetilen kaynakların yerine geçebilecek potansiyele sahip olduklarından ilgi görmektedirler (Aguilar-Reynosa vd., 2017). Biyoetanolin yenilenebilir ve sürdürülebilir olması, depolamasının kolay olması, yüksek oksijen içeriği ve yüksek oktan numarası sebebiyle konvansiyonel yakıtlara karşı üstünlüğü vardır (Putra vd., 2015). Yer fıstığı kabuğu gibi lignoselülozik biyoküteller, biyoetanol üretiminde kullanılabilir.

Her yıl dünya genelinde yaklaşık 200 milyar ton saman, kabuk ve küspe gibi lignoselülozik tarımsal atık açığa çıkmaktadır (Tuck vd., 2012). Bu tarımsal atıklar yüksek miktarda lignoselülozik materyal (selüloz, hemiselüloz ve lignin), düşük miktarda ham protein, kül, yapısal olmayan karbonhidratlar ve sekonder metabolitler

içermektedir (Naz vd., 2017). Fıstık kabuğu çok bol bulunan bir tarımsal atıktır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün raporuna göre, dünya genelinde yer fıstığı üretimi 46 milyon tondur. Yer fıstığının ağırlığının %20'sini kabuğu oluşturmaktadır ki bu 9.2 milyon ton yapmaktadır (Carneiro vd., 2017).

Yer fıstığı kabuğu %37.1 selüloz, %33.4 hemiselüloz ve %15 lignin (Polachini vd., 2016) içermektedir (Demirbaş, 1999). Yer fıstığı kabuğu gibi lignoselülozik materyallerden biyoyakıt üretiminde fiziksel, kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik ön işlemlerle, biyokütlenin kompleks yapısı parçalanarak selüloz ve hemiselüloz açığa çıkarılmaktadır. Kullanılacak hammaddenin yapısı dikkate alınarak seçilen ön işlemlerde, düşük enerjinin harcanacağı, düşük inhibitör maddelerin oluşacağı ve yüksek basit şekerlerin oluşacağı yöntem tercih edilmektedir (Sun ve Cheng, 2002)

Lignoselülozik materyalin yapısında bulunan lignin bazı durumlarda istenen bazı durumlar da ise istenmeyen bir bileşendir. Lignoselülozik materyal termokimyasal yöntemler kullanılarak enerjiye dönüşümü sağlandığında lignin açığa çıkan enerji miktarını arttırmaktadır. Fermantasyon ile enerji dönüşümünde ise, ligninin yapısında bulunan fenolik bileşenlerin inhibisyon etkisi nedeniyle açığa çıkan enerjinin miktarında azalma olmaktadır (Frei, 2013).

Bu çalışmada ülkemizde birer atık olan ve doğrudan yakılmak suretiyle enerji kaynağı olarak kullanılan yer fıstığı kabuğunun ikinci nesil biyoyakıt üretiminde biyokütle olarak kullanılabilirliği ve verimi araştırılmıştır. Bu amaçla fermantasyon ortamı için uygun kabuk miktarı, uygun hidroliz sıcaklıkları, Accellerase 1500 enzim kullanımı, inkübasyon koşulları, inokülasyon oranı, azot kaynağı olarak farklı miktarlarda soya unu ve amonyum sülfat denenmiştir. Yer fıstığı kabuğu ile farklı çalışmalar olmasına rağmen, soya ununun azot kaynağı olarak kullanıldığı, enzimatik hidroliz aşamasında Accellerase 1500 enziminin kullanıldığı ve fermantasyonun oda sıcaklığında gerçekleştirilmesi açısından diğer çalışmalardan ayrılmaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Yer fıstığı kabuğu Adana/Çukurova'da bulunan Erdoğan Kuruyemiş'ten temin edilmiştir. Yer fıstığı kabuğu 0.097 µm por çapında APEX-MILL ile öğütülmüştür ve öğütme işleminin ardından 60°C'de 24 saat kurutulmuştur.

Mikroorganizmanın Hazırlanması

Denemelerde Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmıştır. Potato Dextrose Agar (PDA; Merck) besiyerinde +4°C'de saklanan maya kültürü, 100 mL'lik erlendeki 20 mL Yeast Peptone Glucose (YPG) besiyerine öze ile ekilmiş ve 24±2°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üç kez yeni YPG besiyerlerine %1 oranında ekim yapılarak deneylerde kullanılacak aktif maya kültürü elde edilmiştir.

Besiyerlerinin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kabuk, distile su ve %1 (v/v) oranında derişik sülfürik asit (Sigma-Aldrich; %95-98 H₂SO₄) ile karıştırılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığına kadar soğutulan karışım filtre kağıdı (Whatman No:1) ile süzölmüştür. Elde edilen süzöntünün pH'sı kalsiyum oksit (CaO) kullanılarak 10'a ayarlanmış ve oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Oluşan katı partiküllerin filtre kağıdı ile uzaklaştırılmasıyla elde edilen süzöntü, derişik H₂SO₄ kullanılarak pH 5'e ayarlanmış, 121°C'de 15 dakika otoklavlanmış ve deneylerde besiyerleri olarak kullanılmıştır.

Besiyerleri steril 100 mL'lik erlenlere 20 mL (aerobik) ve 12 mL'lik vidalı kapaklı tüpleri dolduracak şekilde (anaerobik) steril koşullarda aktarılmıştır. Üç kez aktifleştirilmiş mayalı YPG besiyerinden %1 oranında hazırlanan besiyerlerine ekim yapılmış ve set üstü çalkalayıcıda (GFL 3005, Almanya) 100 rpm'de 24±2°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Kabuk konsantrasyonu ve oksijenin etkisi

Denemelerde %2.5, %5 ve %10 (w/v) kabuk olacak şekilde distile su ile hazırlanan besiyerleri

aerobik koşullarda erlenlerde ve anaerobik koşullarda vidalı kapaklı tüplerde geliştirilmiştir.

Sıcaklığın hidroliz ortamına etkisi

Kabuk oranı %10 (w/v) olacak şekilde hazırlanan üç besiyerleri sırasıyla 24°C'de, 90°C'de ve 121°C 1.5 atm basınçta her biri 15 dakika süreyle hidrolize bırakılmıştır. Hidroliz sonrası elde edilen süzöntü, CaO ile muamele edilmiş, pH'ı 5'e ayarlanmış, otoklavlanmış ve erlenlerde aerobik şartlarda yapılan deneylerde kullanılmıştır.

Soya ununun etkisi

Erlenlerde aerobik şartlarda yapılan denemelerde, %10 (w/v) kabuk içeren besiyerleri, 1 ve 5 g/L soya unu (Doğalsan Marka) içerecek şekilde hazırlanarak kullanılmıştır.

Enzim uygulaması ve farklı azot kaynaklarının etkisi

Distile su, %10 (w/v) kabuk ve %1 (v/v) oranında derişik H₂SO₄ karıştırılarak 121°C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası elde edilen karışımın pH'ı steril koşullarda NaOH ile 5'e ayarlanmıştır. Karışıma Accellerase 1500 enzimi (%4 v/v) eklenerek 50°C'de 72 saat bekletilmiştir. Enzim uygulaması sonrası karışımlar steril koşullarda steril filtre kağıtları ile süzölmüş ve elde edilen süzöntüler besiyeri olarak deneylerde kullanılmıştır. Azot kaynaklarının etkisini izlemek amacıyla besiyerlerine 1 g/L amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), 0.5 g/L, 1 g/L, 2 g/L soya unu ilave edilmiştir. Deneyler erlenlerde aerobik şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Enzim uygulamasında inkübasyon süresi ve inokülasyon oranının etkisi

Besiyerleri 1 g/L soya unu ile hazırlanmış, %1 ve %10 oranında inokülasyon yapılarak aerobik şartlarda erlenlerde 6, 12 ve 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

Analiz Yöntemleri

Araştırmada denenen her bir parametre için optik yoğunluk (OD) ve şeker analizi fotometrik olarak (Shimadzu UV 12001 V), etanol tayini ise gaz kromatografisi ile (Shimadzu 2010, restek kolon rtx-wax 60m 0.25 mm iç çap) yapılmıştır. Gaz kromatografisi çalışma koşulları yapılan

optimizasyon sonucu; enjeksiyon portu sıcaklığı 140°C, dedektör sıcaklığı 160°C, başlangıç kolon sıcaklığı 50°C ve 19 dakika içerisinde 150°C' ye yükseltilmiştir, kolon basıncı 200kPa, kolon akış hızı 1.86 mL/dk, toplam akış hızı 190.4 mL/dk ve taşıyıcı gaz olarak nitrojen kullanılmıştır (Takeda vd., 2011; Wistara vd., 2016).

Fermantasyon ortamlarından alınan örnekler (2 mL), 5000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant şeker ve alkol analizi için, pelet ise OD tayininde kullanılmıştır.

Optik Yoğunluk tayini

İki kez distile su ile yıkanan peletlerin 600 nm dalga boyundaki optik yoğunlukları distile suya karşı okunmuştur.

Etanol tayini

Optik yoğunluk analizinde hazırlanan süpernatantlar 0.45µm por çapına sahip Millipore filtrelerden süzöldükten sonra Hamilton Enjektörü yardımıyla 1 µL alınarak gaz kromatografisinde analiz edilmiştir.

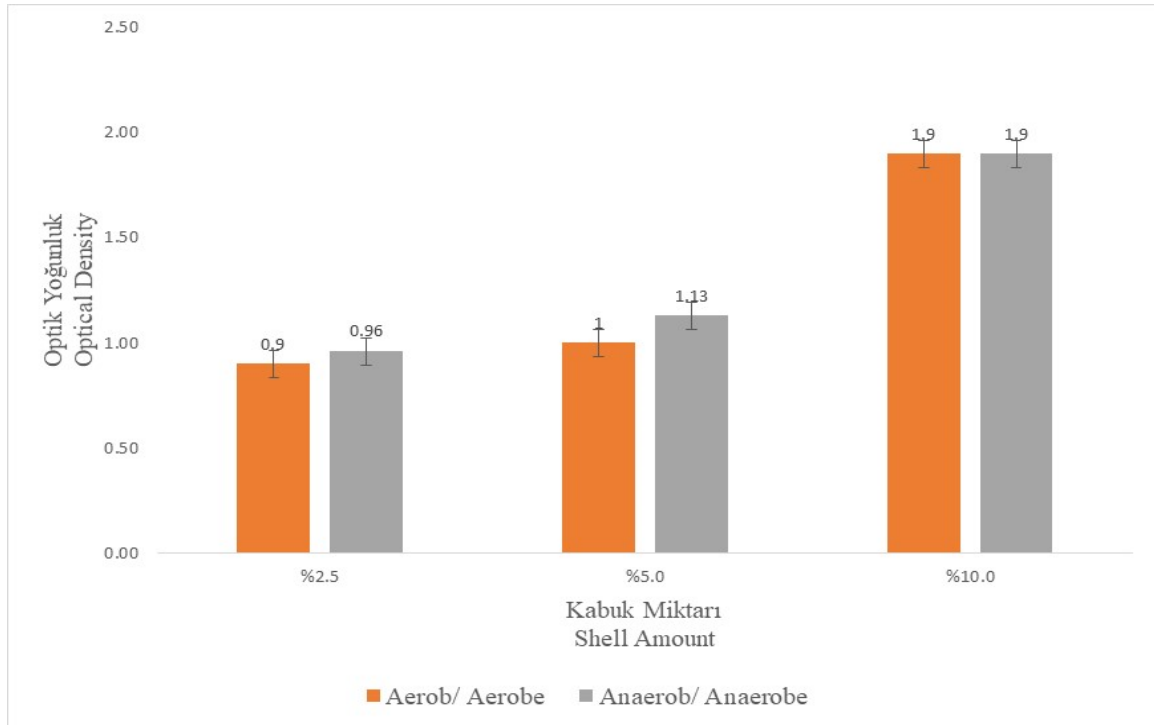
Toplam indirgen şeker tayini

Araştırma boyunca denenen her bir parametrenin şeker analizi Miller' ın (1959) önerdiği 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) yöntemi ile yapılmıştır. Örnekler 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kabuk konsantrasyonunun etkisi

Biyoetanol üretiminde kullanılacak uygun besiyerinin belirlenmesi amacıyla, %2.5, %5 ve %10 olmak üzere üç farklı kabuk konsantrasyonunda besiyerleri hazırlanmıştır. Denemelerde otoklav sonrası oluşan furan bileşiklerinin giderilmesi için CaO kullanılmıştır. Hazırlanan besiyerlerinde aktifleştirilmiş maya kültürleri 100 mL'lik erlenlerde aerobik koşullarda ve 12 mL'lik vidalı kapaklı tüplerde anaerobik koşullarda 24 saatlik süre ile geliştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda maya optik yoğunlukları ölçülüp sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Farklı kabuk konsantrasyonlarının ve aerobik- anaerobik şartların maya gelişimine etkisi
Figure 1. Effect of different amount of shell and aerobic-anaerobic conditions on yeast growth

Yapılan denemelerde artan kabuk konsantrasyonlarının maya gelişimini olumlu yönde etkilediği ve en yüksek maya gelişimine %10 fıstık kabuğu içeren besiyerlerinde ulaşıldığı görülmüştür. Kullanılan tüm kabuk konsantrasyonlarında aerobik ve anaerobik koşulların maya gelişiminde belirgin bir farklılık oluşturmadığı saptanmıştır. Denenen en yüksek kabuk konsantrasyonu olan %10 kabuk içeren besiyerinde ise her iki koşulda da 1.9 olarak aynı maya gelişiminin olduğu bulunmuştur. Uygulama kolaylığı ve endüstriye uyumunun daha kolay olması nedeniyle sonraki deneylerde aerobik şartlar ve %10 fıstık kabuğu kullanılmıştır.

Mısır ve patates kabuğu kullanılarak yapılan bir çalışmada, araştırmacılar besiyeri hazırlarken %5 (w/v), %10 (w/v) ve %15 (w/v) olmak üzere üç farklı substrat yoğunluğu deneyerek etanol üretimi için en uygun konsantrasyonu araştırmışlardır. Yapılan çalışmada araştırmacılar en yüksek etanol verimine %10 (w/v) substrat konsantrasyonunda ulaşmışlardır (Meenakshi ve Kumaresan, 2014).

Sıcaklığın hidroliz ortamına etkisi

Lignoselülozik materyalden biyoetanol üretirken en önemli basamak hidroliz koşullarının optimize edilmesidir (Gu vd., 2013). Soya fasülyesi atığından biyoetanol üretilen bir çalışmada araştırmacılar biyokütleyi otoklavda 121°C' de 20 dakika hidrolize bırakmışlardır (Choi vd., 2015). Halofilik mikroalglerle yapılan çalışmada farklı hidroliz koşulları denenmiş ve en yüksek etanol verimine %1 (v/v) derişik H₂SO₄ ve 121°C' de 15 dk hidroliz edilerek ulaşılmıştır. Yine aynı çalışmada %0.5 (v/v), %1 (v/v) ve %2 (v/v) derişik sülfirik asit denenmiş ve en yüksek etanol üretimine %1 (v/v) sülfirik asit değerinde ulaşılmıştır (Karatay vd., 2016).

Maya gelişimine hidroliz sıcaklığının etkisinin araştırıldığı denemelerde, %10 fıstık kabuğu içeren besiyerleri sırasıyla oda sıcaklığında (24±2°C), 90°C'de ve 121°C 1.5 atm basınçlı otoklav ortamında hidrolize bırakılmış ve süre sonunda CaO ile muamele edilerek furan bileşikleri besiyerlerinden uzaklaştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmiştir. Yapılan denemelerde en yüksek maya optik yoğunluklarına 90°C'de ve 121°C 1.5 atm basınçlı

otoklav ortamında ulaşılmış olup bu değerler sırasıyla 1.8 ve 1.9 olarak ölçülmüştür. Daha sonraki denemelerde hidroliz için otoklav koşulları tercih edilmiştir.

Çizelge 1. Farklı hidroliz sıcaklıkları ve maya optik yoğunluklarına etkileri.

Table 1. Effect of different hydrolysis temperatures on yeast absorbance

Koşullar <i>Conditions</i>	Optik Yoğunluk <i>Optical Density</i>
24°C	0.5
90°C	1.8
121°C + 1.5 atm	1.9

Soya ununun maya gelişimine etkisi

Soya unununun maya gelişimine etkisinin araştırılması amacıyla, hazırlanan besiyerlerine 1 g/L ve 5 g/L soya unu ilave edilmiş ve soya unu içermeyen kontrol grubuyla birlikte aerobik şartlarda 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonucu besiyerlerindeki maya optik yoğunlukları Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. Farklı miktarlardaki soya unununun maya gelişimine etkisi

Table 2. Effect of different amounts soy flours on yeast growth

Soya Unu (g/L) <i>Soy Floun (g/L)</i>	Optik Yoğunluk <i>Optical Density</i>
Kontrol/ <i>Control</i>	1.9
1	2.1
5	1.9

Yapılan denemeler sonucunda besi ortamına ilave edilen 1 g/L soya unununun maya gelişimini olumlu yönde etkileyerek maya optik yoğunluklarını 1.9'dan 2.1'e yükselttiği saptanmıştır. Besiyerine ilave edilen 5 g/L soya unununun ise maya gelişimi üzerinde herhangi bir etki göstermediği bulunmuştur. Deneylerin bu aşamasında fıstık kabuğu kullanılarak en yüksek maya gelişimi olan 2.1 optik yoğunluğuna 1 g/L soya unu içeren %10 kabuklu besiyerinde ulaşıldığı görülmüştür.

Enzim uygulaması ve diğer azot kaynaklarının maya gelişimine etkisi

Accellerase 1500 yüksek β-glukozidaz ve selüloz aktivitesi sayesinde selülozu parçalayarak onları 6

karbonlu şekerlere dönüştürür. Bu dönüşüm oranı %98'e kadar çıkabilmektedir (Dadi vd., 2006; Saha ve Cotta, 2006). Dönüşüm verimini etkileyen en önemli parametre ortamda bulunan selülozdur (Wang vd., 2011). Şeker kamışı küspesinden samana, katı atıklardan mısır koçanına kadar birçok farklı lignoselülozik materyalin hidrolizi için kullanılabilir. Leitner ve Lindorfer (2016) samanı Accellerase 1500 ile 50°C'de 72 saat inkübasyona bırakmıştır.

Fermentasyon ortamına maya gelişimini desteklemesi açısından amonyum sülfat, magnezyum sülfat, potasyum fosfat ve soya unu gibi katkıları ilave edilebilmektedir (Tuncay, 1999; Cho vd., 2011; Dussán vd., 2014; Trigueros vd., 2016). Azot ile yapılan çalışmalarda, azotun *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişimine, üretilen etanol miktarına ve kalitesine son derece olumlu bir etki yarattığı gösterilmiştir (García-Ríos vd., 2014; Bely vd., 1990).

Maya gelişimini arttırmak amacıyla planlanan bu çalışmalarda, derişik H₂SO₄ hidrolizi sonrası Accellerase 1500 ile sakkarifikasyon evresi tamamlandıktan sonra besiyerlerine farklı miktarlarda soya unu ve 1 g/L (NH₄)₂SO₄ eklenerek aerobik şartlarda erlenlerde maya gelişimi 24 saat süre ile izlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ölçülen maya optik yoğunlukları Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Farklı soya unu (SU) konsantrasyonları ve amonyum sülfatın (AS) maya gelişimine etkisi
Table 3. Effect of different amounts soy flours (SF) and ammonium sulphate (AS) on yeast growth

Azot Kaynağı (g/L) <i>Nitrogen Sources (g/L)</i>	Optik Yoğunluk <i>Optical Density</i>
Kontrol/Control	4.19
1 A.S.	3.88
0.5 S.U./S.F.	4.55
1 S.U./S.F.	4.85
2 S.U./S.F.	4.85

Enzim kullanılarak yapılan bu denemelerde kontrol olan sadece kabuk içeren besiyerlerinde maya gelişimi 4.19 olarak ölçülmüştür. Bu değer in önceki denemelerde 1.9 olması, enzim

uygulanmasının maya gelişimini yaklaşık iki kat daha fazla etkilediğini göstermektedir.

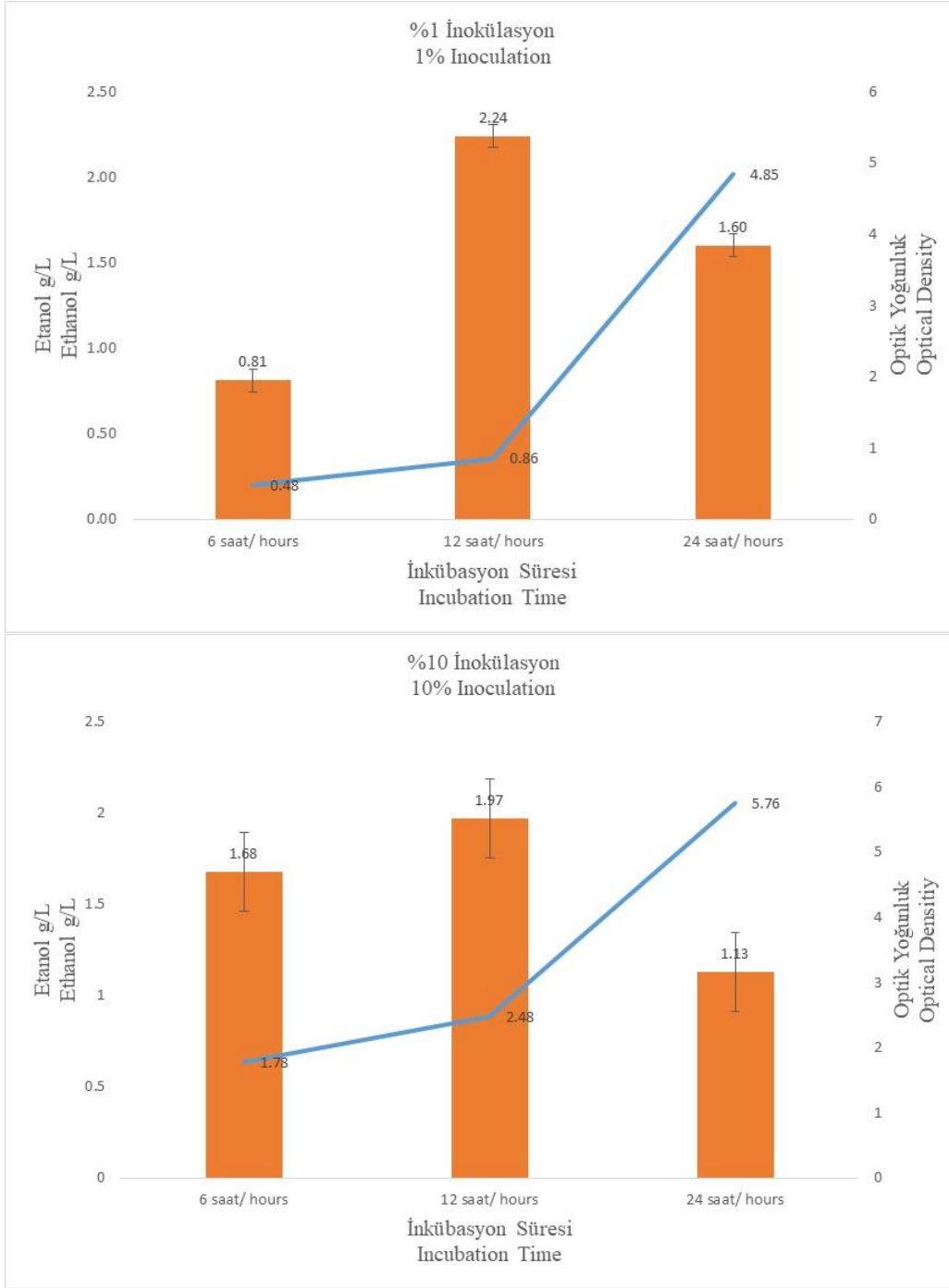
Daha önceki denemelerde soya ununun maya gelişimine olumlu katkısı gösterilmiştir. Enzim uygulanan bu deneyde de soya ununun farklı konsantrasyonları deneyerek maya gelişimi artırılmak istenmiştir. Yapılan deneylerde 0.5 g/L, 1 g/L ve 2 g/L olmak üzere üç farklı soya unu konsantrasyonu ve ayrıca 1 g/L (NH₄)₂SO₄ içeren besiyerleri kullanılmıştır. Denemeler sonucu maya gelişiminin en yüksek olduğu soya unu konsantrasyonu 1 g/L olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonda maya gelişimi kontrolden biraz daha artarak 4.85 olarak ölçülmüştür. Soya ununun maya gelişimine olumlu etkisi 2 g/L'ye kadar devam etmekle birlikte, 1 g/L ve 2 g/L konsantrasyonları arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Besiyerine ilave edilen (NH₄)₂SO₄'ın maya gelişimine olumlu bir katkı sağlamadığı görülmüş ve sonraki deneylerde 1 g/L soya unu içeren besiyerleri kullanılmıştır.

Enzim uygulamasında inkübasyon süresi ve inokülasyon oranının etkisi

Enzimle hazırlanan besiyerlerine 1 g/L soya unu eklenip %1 ve %10 oranında ekim yapılarak 6, 12 ve 24 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. Deney aerobik şartlarda erlenlerde gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları Şekil 2 a ve b ve Çizelge 4'de gösterilmiştir.

Uygulanan %1 inokülasyon sonucunda ilk 6. saatte maya optik yoğunluğu 0.48 etanol miktarı ise 0.81 g/L olarak ölçülmüştür. İnkübasyon süresi 12. saate ulaştığında maya optik yoğunluğu 0.48'den 0.86'a yükselmiş etanol miktarı ise 0.88'den 2.24 g/L düzeyine yükselmiştir. İnkübasyon süresi 24. saate ulaştığında maya optik yoğunluğu 4.85'e ulaşmış ve etanol miktarı da 1.60 g/L olarak ölçülmüştür. Denemeler sonucu en yüksek etanol verimine inokülasyon oranı %1 olan besiyerinde 12. saatte ulaşıldığı görülmüştür (Şekil 2 a).



Şekil 2a. %1 inokülasyon oranının saatlik maya optik yoğunluk ve etanol değerleri.

b. %10 inokülasyon oranının saatlik maya optik yoğunluk ve etanol değerleri

Figure 2a. Yeast optical density and ethanol values under 1% inoculation.

b. Yeast optical density and ethanol values under 10% inoculation

Çizelge 4. Farklı inokülasyon oranlarında inkübasyon süresi boyunca kullanılan şeker yüzdeleri
 Table 4. Different inoculation rates and consumed sugar percentages during the incubation

Saatler Hours	%1 İnokülasyon 1% Inoculation	%10 İnokülasyon 10% Inoculation
6	25%	66.60%
12	66.60%	66.60%
24	75%	76%

İnokülasyon oranı %1'den %10'a artırıldığında 6, 12 ve 24. saatlerde maya optik yoğunlukları sırasıyla 1.78, 2.48 ve 5.76 olarak ölçülmüştür. Buna bağlı olarak etanol miktarının 6. saatte 1.68 g/L, 12. saatte 1.97 g/L ve 24. saatte ise 1.13 g/L olduğu bulunmuştur. Denemelerde %1 inokülasyondan farklı olarak 6. ve 12. saatlerde yüksek etanol üretiminin olduğu görülmüştür. Sonuçlar Şekil 2 b'de gösterilmiştir. Her iki inokülasyon oranında da maya gelişimi inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak artmıştır. En yüksek etanol verimine %1 inokülasyonda 12. saatte, 0.86 optik yoğunlukta, 2.24 g/L olarak, %10 inokülasyonda ise 6. ve 12. saatlerde ulaşıldığı görülmüştür.

Deneylerde kullanılan mayanın primer metabolit olan etanolü logaritmik üreme evresinin başlangıcında olduğunda yüksek oranda ürettiği, artan inkübasyon süresinin maya gelişimini arttırdığı ancak etanol miktarını düşürdüğü ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4'de farklı inokülasyon oranlarında inkübasyon süresi boyunca kullanılan şeker yüzdeleri verilmiştir. En yüksek etanol üretiminin görüldüğü %1 inokülasyon oranında 12. saatte maya yoğunluğu birin altında olduğunda besiyerindeki şekerin %66'sı kullanılmıştır. Denemelerde birden yüksek optik yoğunluk değerlerinde mayanın besiyerindeki şekerin en fazla %10'unu kullandığı ve maksimum kullanılan şeker yüzdesinin %76'ya ulaştığı görülmüştür. Bu sonuçlar hazırlanan besiyerinde maya tarafından kullanılmayan %25 oranında şeker benzeri maddenin olduğunu göstermektedir. Şeker analizinde kullanılan DNS yöntemi ile mayanın kullanmadığı şekerler de ölçülmüştür.

SONUÇLAR

Yapılan çalışmada, her yıl dünyada ve ülkemizde bol miktarda açığa çıkan yer fıstığı kabuğunun biyoetanol üretim kapasitesi araştırılmış ve süreç optimize edilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda hazırlanan besiyerindeki uygun kabuk konsantrasyonları, uygun azot miktarı, fermantasyon süresi ve inokülasyon oranı araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişebilmesi için gerekli altı karbonlu şekerler, ham madde olarak seçilen lignoselülozik atıklardaki selüloz ve hemiselülozun dönüşümünden elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan Accellerase 1500 ile açığa çıkan basit şeker miktarı artırılmıştır ve buna paralel olarak üretilen etanol miktarı da artmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişimi ve etanol verimi için oldukça önemli bir yere sahip olan azot, soya unu gibi eldesi kolay bir maddeden sağlanmış ve amonyum sülfat ile karşılaştırıldığında daha ucuz ve etkili olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışma, Accellerase 1500 enzim uygulaması ve fermantasyonun oda sıcaklığında gerçekleşmesi bakımından ilk olma özelliği taşımaktadır. Azot kaynağı olarak ortama ilave edilen soya unu, mikroorganizma gelişimi ve etanol üretimine olumlu katkıda bulunmuştur. Böylece 12 saat gibi kısa bir sürede fıstık kabuğu ile hazırlanan besiyerinden %61.7'lik verimle 2.24 g/L etanol üretimi sağlanmıştır. Düşük maliyetle hazırlanan fıstık kabuğu besiyeri, biyoetanol üretiminde umut vericidir.

KAYNAKLAR

Aguilar-Reynosa, A., Romani, A., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguilar, C.N., Garrote, G., Ruiz, H.A., (2017). Comparison of microwave and conduction-convection heating autohydrolysis pretreatment for bioethanol production. *Biore Sour*

- Technol*, 243, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.096>
- Ari, T., Dönmez, S., (1999). Melastan Etil Alkol Üretiminde Soya Ununun Alkol ve Hücre Konsantrasyonuna Etkisi. *Turkish J Biol*, 24, 573–584.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., Barre, P., (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *J Ferment Bioeng*, 70, 246–252. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90057-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(90)90057-4)
- Carneiro, A.P., Rodriguez, O., Macedo, E.A., (2017). Dissolution and fractionation of nut shells in ionic liquids. *Bioresour Technol*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.112>
- Cho, D.H., Shin, S.J., Bae, Y., Park, C., Kim, Y.H., (2011). Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using *Pichia stipitis*. *Bioresour Technol*, 102, 4439–4443. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.094>
- Choi, I.S., Kim, Y.G., Jung, J.K., Bae, H.J., (2015). Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production. *Energy*, <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.09.093>
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A., (2006). Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnol Bioeng*, 95, 904–910. <https://doi.org/10.1002/bit.21047>
- Demirbaş, A., (1999). Properties of charcoal derived from hazelnut shell and the production of briquettes using pyrolytic oil. *Energy*, 24, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0360-5442\(98\)00077-2](https://doi.org/10.1016/S0360-5442(98)00077-2)
- Dussán, K.J., Silva, D.D. V, Moraes, E.J.C., Priscila, V., Felipe, M.G. a, (2014). Dilute-acid Hydrolysis of Cellulose to Glucose from Sugarcane Bagasse. *Chem Eng Trans*, 38, 433–438. <https://doi.org/10.3303/CET1438073>
- Frei, M., (2013). Lignin: Characterization of a multifaceted crop component. *Sci World J*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/436517>
- García-Ríos, E., Gutiérrez, A., Salvadó, Z.Z., Arroyo-López, F.N., Guillamon, J.M., (2014). The Fitness Advantage of Commercial Wine Yeasts in Relation to the Nitrogen Concentration, Temperature, and Ethanol Content under Microvinification Conditions. *Appl Environ Microbiol*, 80, 704–713. <https://doi.org/10.1128/AEM.03405-13>
- Gu, T., Held, M.A., Faik, A., (2013). Supercritical CO₂ and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production. *Environ Technol*, (United Kingdom). <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.809777>
- Karatay, S.E., Erdoğan, M., Dönmez, S., Dönmez, G., (2016). Experimental investigations on bioethanol production from halophilic microalgal biomass. *Ecol Eng*, <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.058>
- Leitner, V., Lindorfer, J., (2016). Evaluation of technology structure based on energy yield from wheat straw for combined bioethanol and biomethane facility. *Renew Energy*, 87, 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.09.037>
- Martín, C., Thomsen, A.B., (2007). Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *J Chem Technol Biotechnol*, 82, 174–181. <https://doi.org/10.1002/jctb.1648>
- Meenakshi, A., Kumaresan, R., (2014). Ethanol production from corn, potato peel waste and its process development. *Int. J. ChemTech Res*,
- Miller, G.L., (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*, 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Naz, A.A., Reinert, S., Bostanci, C., Seperi, B., Leon, J., Böttger, C., Südekum, K.-H., Frei, M., (2017). Mining the global diversity for bioenergy traits of barley straw: Genomewide association study under varying plant water status. *GCB Bioenergy*, <https://doi.org/10.1111/gcbb.12433>
- Polachini, T.C., Sato, A.C.K., Cunha, R.L., Telis-Romero, J., (2016). Density and rheology of acid suspensions of peanut waste in different conditions: An engineering basis for bioethanol

- production. *Powder Technol*, 294, 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2016.02.022>
- Putra, M.D., Abasaeed, A.E., Atiyeh, H.K., Al-Zahrani, S.M., Gaily, M.H., Sulieman, A.K., Zeinelabdeen, M.A., (2015). Kinetic Modeling and Enhanced Production of Fructose and Ethanol From Date Fruit Extract. *Chem Eng Commun*, 202, 1618–1627. <https://doi.org/10.1080/00986445.2014.968711>
- Rouhollah, H., Iraj, N., Giti, E., Sorah, A., (2007). Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. *African J Biotechnol*, 6, 1110–1114.
- Saha, B.C., Cotta, M.A., (2006). Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnol Prog*, 22, 449–453. <https://doi.org/10.1021/bp050310r>
- Sarkar, N., Ghosh, S.K., Bannerjee, S., Aikat, K., (2012). Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy*, 37, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- Socol, C.R., Vandenberghe, L.P. de S., Medeiros, A.B.P., Karp, S.G., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L.M.F., Ferrara, M.A., Silva Bon, E.P. da, Moraes, L.M.P. de, Araújo, J. de A., Torres, F.A.G., (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour Technol*, 101, 4820–4825. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.067>
- Sun, Y., Cheng, J., (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol*, 83, 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Takeda, H., Yoneyama, F., Kawai, S., Hashimoto, W., Murata, K., (2011). Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy Environ Sci*, 4, 2575–2581. <https://doi.org/10.1039/c1ee01236c>
- Trigueros, D.E.G., Fiorese, M.L., Kroumov, A.D., Hinterholz, C.L., Nadai, B.L., Assunção, G.M., (2016). Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Biochem Eng J*, 110, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.02.014>
- Tuck, C.O., Pérez, E., Horváth, I.T., Sheldon, R.A., Poliakoff, M., (2012). Valorization of biomass: Deriving more value from waste. *Science* (80-.), <https://doi.org/10.1126/science.1218930>
- Wang, W., Kang, L., Wei, H., Arora, R., Lee, Y.Y., (2011). Study on the decreased sugar yield in enzymatic hydrolysis of cellulosic substrate at high solid loading. *Appl Biochem Biotechnol*, 164, 1139–1149. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9200-8>
- Wistara, N.J., Pelawi, R., Fatriasari, W., (2016). The Effect of Lignin Content and Freeness of Pulp on the Bioethanol Productivity of Jabon Wood. *Waste and Biomass Valorization*, 7, 1141–1146. <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9510-8>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Suely, A., Boyce, A.N., Faruq, G., (2017). Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew Sustain Energy Rev*, 71, 475–501. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

AYDIN İLİNDE TÜKETİLEN SEBZE VE MEYVELERİN ESER ELEMENT DERİŞİMLERİNİN TAYİNİ

Gülşen Güven*

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Aydın, Türkiye

Geliş / Received: 29.11.2018; Kabul / Accepted: 09.02.2019; Online baskı / Published online: 19.03.2019

Güven, G. (2019). Aydın ilinde tüketilen sebze ve meyvelerin eser element derişimlerinin tayini. *GIDA* (2019) 44 (2): 301-308 doi: 10.15237/gida.GD18123

Güven, G. (2019). Determination of trace element concentrations of vegetables and fruits consumed in aydin province. *GIDA* (2019) 44 (2): 301-308 doi: 10.15237/gida.GD18123

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Aydın'da satılan çeşitli meyve ve sebzelerde kadmiyum (Cd), kobalt (Co), bakır (Cu), krom (Cr), demir (Fe), kurşun (Pb), mangan (Mn), nikel (Ni) ve çinko (Zn) derişimini değerlendirmektir. Bu eser elementler indüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometrisi (ICP OES) ile tayin edildi. İncelenen elementlerin derişim aralığı, kadmiyum, kobalt, bakır, krom, demir, kurşun, mangan, nikel ve çinko için sırasıyla 0-0.27 µg/g, 0-0.40 µg/g, 3.23-25.05 µg/g, 0-0.33 µg/g, 7.35-554.86 µg/g, 0-2.19 µg/g, 0-58.34 µg/g, 1.03-16.84 µg/g, 4.02-48.55 µg/g'dır. Metodun doğruluğu standart referans madde (liyofilize edilmiş esmer ekmeç-BCR 191) kullanılarak tayin edildi. Bulunan değerler sertifikalı referans değerler ile uyumludur. **Anahtar kelimeler:** Eser element, sebze, meyve, ICP OES.

DETERMINATION OF TRACE ELEMENT CONCENTRATIONS OF VEGETABLES AND FRUITS CONSUMED IN AYDIN PROVINCE

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the concentration of cadmium (Cd), cobalt (Co), copper (Cu), chromium (Cr), iron (Fe), lead (Pb), manganese (Mn), nickel (Ni) and zinc (Zn) in various fruits and vegetables sold in Aydın. These trace elements were determined by inductively coupled plasma optic emission spectrometry (ICP OES). The concentration range of the investigated elements were 0-0.27 µg/g, 0-0.40 µg/g, 3.23-25.05 µg/g, 0-0.33 µg/g, 7.35-554.86 µg/g, 0-2.19 µg/g, 0-58.34 µg/g, 1.03-16.84 µg/g, 4.02-48.55 µg/g for cadmium, cobalt, copper, chromium, iron, lead, manganese, nickel, and zinc, respectively. The accuracy of the method was determined by using of a standard reference material (lyophilised brown bread-BCR 191). The determined values were in agreement with the certified reference values.

Keywords: Trace element, vegetable, fruit, ICP OES.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ gguven@adu.edu.tr,

☎ (+90) 256 212 8498

☎ (+90) 256 213 5379

GİRİŞ

Günümüzde en önemli toplumsal sorunlardan birisi çevre kirlenmesidir. Endüstri, trafik vb. insan faaliyetlerinin sonucu olarak ortaya çıkan, kimyasal çevre kirlenmeleri insan sağlığını olumsuz etkilemekte ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Baykal ve Baykal, 2008). Kimyasal çevre kirlenmeleri nedeniyle toksik kirleticiler gıda maddelerine çeşitli yollarla bulaşabilmektedir (Yusuf vd., 2003). Bunlar içinde insan sağlığını tehdit eden maddelerden en önemlilerinden biri ağır metallerdir. Bunlardan başka pestisitler, poliaromatik hidrokarbonlar, dioksinler, kimyasal gübreler gibi kirleticiler gıdalarda istenmeyen maddelerdir. Gıda güvenliği önemli bir halk sağlığı endişesidir (D'Mello, 2003; De Santis ve Moresi, 2007). Bu sorun özellikle gelişmekte olan ülkelerde giderek daha ciddi bir hal almaktadır. Gıdalara toksik element bulaşması çok çeşitli kaynaklardan olmaktadır. Kirlenmiş su ile sulama, gübre ve metal içeren pestisit ilavesi, endüstriyel emisyonlar, nakliye, hasat süreci vb. sebepler ile ağır metal kirliliği oluşabilir. Bir kirletici kaynaktan doğaya bulaşan toksik metaller doğadan bitkilere geçmekte, insanlar ve hayvanlar tarafından gıdalarla birlikte alınmakta, yeniden doğaya dönmekte veya canlı bünyesinde birikim yapmaktadır (Jarup,2003; Sathawara vd., 2004; Wang vd.,2005; Khan vd., 2008).

Eser elementler buldukları ortamda ana bileşen yanında çok küçük derişimde (sıvılarda mg/L, katılarda mg/kg) olan elementlerdir. Yoğunluğu 5 g/cm³'ten büyük olan veya atom kütlesi 50 g/mol ve daha büyük olan metallere ağır metal denir. Arsenik, kurşun, kadmiyum, civa gibi elementler toksik ağır metaller olarak bilinmektedir (Falandysz vd, 2007). Toksik ağır metaller genellikle biyolojik olarak parçalanmazlar ve organlarda birikme potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle de insan sağlığına olumsuz etkileri vardır. Sınır değerlerin altında toksik olmayan ve vücut için esansiyel olan bazı metaller bulunmaktadır. Bu metaller fazla miktarlarda alınmaları halinde toksik etki göstermektedirler. Bunlara demir, mangan, bakır, çinko ve selenyum örnek olarak verilebilir (Munoz-Olivas ve Camara, 2001; Divrikli vd., 2003; Tüzen,2003; Dunder ve Sağlam, 2004; Celik ve Oehlenschlager, 2007).

Sebzeler ve meyveler, insan beslenmesinde önemli rol oynamaktadır. Vitamin, mineral, lif ve antioksidanlar açısından zengindirler. Potansiyel toksisiteyi, sebze ve meyvelerin tüketimini göz önünde bulundurarak, bu kirletici maddelerin seviyelerinin mutabık kalınan uluslararası şartları karşıladığından emin olmak için gıda maddelerini analiz etmek gereklidir. Gıda maddelerinde ağır metal içeriklerinin düzenli olarak araştırılması ve izlenmesi programları, gelişmiş ülkelerin çoğunda on yıllardır yürütülmektedir. Gıda maddelerinde eser ve ağır metal iyonlarının belirlenmesi için gıda örneklerinin analizinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur (Radwan ve Salama, 2006; Saracoglu vd., 2007; Duran vd., 2008; Tuzen vd., 2008; Shaheen vd., 2016). Gıda zincirindeki kirlilik riskinin artmasıyla ilgili olarak gıda kalitesi ile ilgili uluslararası ve ulusal yönetmelikler, gıda maddelerinde izin verilen azami toksik element derişimlerini azalttı (Radwan ve Salama, 2006). Bu çalışmanın amacı Aydın ilinde marketlerde ve halk pazarlarında satılan çeşitli sebze ve meyvelerdeki kadmiyum, kurşun, kobalt, bakır, krom, demir, mangan, nikel ve çinko derişimlerini belirlemektir. Ayrıca bulunan sonuçlar, ulusal yönetmeliklerde belirtilen sınır değerler ile karşılaştırıldı.

MATERYAL METOT

Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflık derecesine sahiptir. Çözeltilerin hazırlanması için Millipore (Molsheim, Fransa) cihazından üretilen Milli-Q kalitesi saf su kullanıldı. Deneylerde kullanılan tüm malzemeler % 10'luk nitrik asit çözeltisi içinde bekletilerek temizlendi ve daha sonra saf su ile çalkalandı. Kalibrasyon grafiği için kullanılan elementlerin standart çözeltileri, Merck (Darmstadt/Almanya) firmasından temin edilen 1000 mg/L stok çözeltilerinin seyreltilmesi ile hazırlandı. Deneysel çalışmalarda standart referans madde Community of Bureau (Belçika) enstitüsünden sağlanan BCR 191-liyofilize edilmiş esmer ekmek Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alındı.

Örnek Alma ve Örneklerin Çözünürleştirilmesi

Aydın'da marketlerden ve halk pazarlarından alınan 25 adet sebze ve 11 adet meyve örneği ilk olarak musluk suyu altında temizlendi. Örnekler saf su ile yıkandıktan sonra, küçük parçalara ayrılarak 70 °C'deki etüvde tamamen kuruyana kadar bekletildi. Kurutulan örnekler analize kadar polietilen kaplarda saklandı. 1.0 gram kurutulmuş örnek tartılıp porselen kroze içerisine aktarıldı ve kül fırını içerisine yerleştirildi. Kül fırını sıcaklığı yavaş yavaş artırılarak 650 °C'ye getirildi ve 16 saat boyunca bu sıcaklıkta bekletildi. Kül olan örnekler üzerine 5 mL % 25'lik (v/v) HNO₃ ilave edildi ve mavi bant süzgeç kağıdından süzöldü (Radwan ve Salama, 2006). Süzölen örnekler 25 mL'ye saf su ile seyreltildi ve ICP OES'de analizlendi. Standart referans madde de sebze meyve örnekleri ile aynı

metot kullanılarak çözünürleştirildi. Sebze meyve örneklerinin yakma işlemi bir kez, standart referans maddenin yakma işlemi üç kez tekrarlandı.

İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi

Örnek çözeltilerinde Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Pb, Mn, Ni ve Zn iyonlarının derişimleri Teledyne Leeman Labs Prism Model aksiyal görüş İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP OES) ile tayin edildi. ICP OES'deki çalışma koşulları çizelge 1'de özetlendi. Bulunan sonuçlar, yapılan seyreltmeler dikkate alınarak kuru ağırlık için mg/kg biriminden hesaplandı. Yapılan analizlerde ICP OES'deki okumalar üç kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

Çizelge 1. ICP-OES çalışma koşulları
Table 1. Working conditions of ICP-OES

ICP-OES	Teledyne Leeman Labs Prism Model aksiyal görüş ICP-OES (Teledyne Leeman Labs Prism Model axial ICP-OES)
Monokromatör (Monochromator)	Eşel spektrometre (200 nm'de 0.008 nm çözünörlük) (Echelle spectrometer(0.08 nm resolution at 200 nm))
Dedektör (detector)	C-PAD dedektör (C-PAD detector)
Sisleştirici (Nebulizer)	Eş merkezli (concentric)
RF jeneratörü (RF generator)	40 MHz
RF gücü (RF power)	1.0 kW
Plazma gaz akışı (Plasma gas flow rate)	19 L/min
Yardımcı gaz akışı (Auxiliary gas flow rate)	0.3 L/min
Nebulizör akışı (Nebulizer flow)	50 psi
Pompa hızı (Pump flow rate)	1.4 mL/min
Dalga boyu (Wavelength)	Cd: 214.441 nm, Co: 228.615 nm, Cu: 324.754 nm, Cr: 206.149 nm, Fe: 259.940 nm, Pb:220.353 nm, Mn:257.610 nm, Ni: 231.604 nm, Zn: 213.856 nm

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı Aydın İlinde tüketilen sebze ve meyvelerin Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Pb, Mn, Ni ve Zn derişimlerini belirlemektir. Sebze ve meyve

örneklerinde bazı eser elementlerin analizi için örnekler önce çözünürleştirildi, daha sonra ICP OES ile analizleri yapıldı. ICP OES'de yapılan analizlerin sonucu Çizelge 2'de verilmektedir.

Çizelge 2. Sebze ve meyve örneklerindeki eser element derişimleri (mg/kg)
 Table 2. Trace element concentrations in vegetable and fruit samples (mg/kg)

Meyveler <i>Fruits</i>	Cd	Co	Cu	Cr	Fe	Pb	Mn	Ni	Zn
Kivi (<i>kiwi</i>)	TSA	TSA	13.57±0.06	TSA	20.10±0.15	0.40±0.06	1.86±0.01	8.00±0.05	10.67±0.09
Ayva (<i>quince</i>)	TSA	0.18±0.01	4.88±0.04	0.33±0.03	9.44±0.09	1.77±0.16	1.07±0.03	2.30±0.04	5.57±0.07
Limon (<i>lemon</i>)	TSA	0.02±0.00	6.23±0.04	TSA	10.81±0.10	TSA	1.85±0.04	2.21±0.07	18.31±0.18
Armut (<i>pear</i>)	TSA	0.10±0.00	8.98±0.08	0.10±0.00	11.15±0.09	0.13±0.01	5.57±0.04	2.02±0.03	4.78±0.04
Portakal (<i>orange</i>)	TSA	0.01±0.00	6.94±0.05	TSA	10.44±0.05	0.20±0.02	1.57±0.02	1.09±0.01	5.80±0.06
Muz (<i>banana</i>)	TSA	TSA	9.88±0.16	TSA	21.48±0.19	0.50±0.04	3.99±0.06	0.79±0.01	6.99±0.10
Çağla (<i>green almond</i>)	TSA	0.04±0.00	8.31±0.09	TSA	72.26±0.36	0.16±0.02	13.22±0.15	6.72±0.11	22.58±0.32
Mandalina (<i>tangerine</i>)	TSA	TSA	4.10±0.03	0.17±0.01	7.35±0.10	TSA	2.32±0.03	1.33±0.06	5.02±0.05
Çilek (<i>strawberry</i>)	TSA	0.10±0.00	12.24±0.10	0.17±0.02	33.30±0.53	0.07±0.00	24.68±0.08	1.03±0.06	22.68±0.23
Kestane (<i>chestnut</i>)	TSA	0.12±0.00	9.78±0.08	TSA	19.77±0.16	TSA	18.02±0.25	1.22±0.03	9.10±0.09
Elma (<i>apple</i>)	TSA	TSA	4.87±0.05	TSA	11.8±0.09	TSA	1.26±0.00	1.33±0.04	4.02±0.03
Sebzeler <i>Vegetables</i>									
Ispanak (<i>spinach</i>)	0.10±0.00 ^a	TSA	10.65±0.20	TSA	353.26±2.73	1.27±0.12	41.2±0.21	5.26±0.04	37.27±0.16
Karalahana (<i>black cabbage</i>)	TSA	TSA	5.66±0.11	TSA	25.69±0.69	TSA	11.86±0.16	5.81±0.02	16.05±0.07
Turp (<i>radish</i>)	TSA	TSA	4.66±0.03	TSA	20.51±0.23	TSA	5.23±0.06	2.99±0.02	13.89±0.09
Patates (<i>potato</i>)	TSA	TSA	3.23±0.04	TSA	13.70±0.14	TSA	2.92±0.04	4.31±0.01	12.24±0.09
Havuç (<i>carrot</i>)	TSA	TSA	6.03±0.07	TSA	9.49±0.08	TSA	2.84±0.03	10.18±0.08	13.21±0.03
Tere (<i>pepperweed</i>)	0.06±0.01	TSA	10.94±0.09	TSA	247.85±3.02	2.19±0.10	33.97±0.46	6.85±0.07	45.51±0.60
Pazı (<i>chard</i>)	TSA	0.34±0.02	12.84±0.10	TSA	384.13±1.27	TSA	58.34±0.18	6.21±0.09	42.70±0.31
Patlıcan (<i>aubergine</i>)	TSA	0.19±0.01	8.69±0.11	TSA	21.68±0.14	TSA	TSA	3.81±0.05	22.76±0.15
Brokoli (<i>broccoli</i>)	TSA	0.15±0.00	5.56±0.05	TSA	31.64±0.16	0.59±0.04	9.2±0.07	2.96±0.03	23.94±0.34
Roka (<i>rocket</i>)	0.27±0.03	0.36±0.02	24.73±0.22	TSA	554.86±6.23	2.08±0.11	38.68±0.20	5.41±0.08	42.62±0.08
Kabak (<i>zucchini</i>)	0.10±0.00	0.37±0.01	15.74±0.08	TSA	54.81±0.65	TSA	14.86±0.10	16.84±0.40	28.17±0.16
Isırgan otu (<i>stinging nettle</i>)	TSA	0.11±0.00	9.44±0.03	TSA	288.60±3.10	TSA	27.47±0.25	1.79±0.04	39.09±0.54
Marul (<i>lettuce</i>)	0.14±0.02	TSA	19.58±0.17	TSA	141.06±2.12	TSA	48.56±0.16	14.77±0.23	44.19±0.37
Biber (<i>pepper</i>)	0.08±0.01	TSA	14.44±0.14	TSA	51.96±0.61	TSA	9.50±0.06	4.93±0.09	14.62±0.09
Mantar (<i>mushroom</i>)	0.04±0.00	TSA	25.05±0.14	TSA	70.31±0.19	TSA	5.62±0.04	1.17±0.02	48.55±0.25
Bakla (<i>java bean</i>)	TSA	0.37±0.02	17.83±0.15	TSA	56.64±0.17	2.50±0.09	13.62±0.11	6.00±0.14	18.62±0.04
Taze fasulye (<i>green bean</i>)	TSA	0.35±0.01	16.81±0.09	TSA	43.31±0.11	1.58±0.13	23.29±0.19	9.45±0.12	24.86±0.17
Domates (<i>tomato</i>)	TSA	TSA	9.15±0.06	TSA	27.96±0.06	TSA	9.67±0.05	2.28±0.04	22.99±0.03
Pırasa (<i>leek</i>)	TSA	TSA	7.31±0.06	TSA	84.76±0.75	TSA	11.41±0.04	5.00±0.08	17.07±0.10
Dereotu (<i>dill</i>)	TSA	0.15±0.00	9.11±0.04	TSA	173.48±1.34	TSA	35.83±1.36	3.93±0.02	41.75±0.36
Bezelye (<i>green pea</i>)	TSA	0.14±0.00	11.98±0.17	TSA	43.18±0.46	TSA	11.13±0.07	7.50±0.07	37.53±0.51
Soğan (<i>onion</i>)	TSA	0.40±0.03	1.75±0.12	TSA	17.39±0.03	TSA	3.43±0.15	1.23±0.10	6.52±0.06
Maydanoz (<i>parsley</i>)	TSA	0.34±0.02	16.77±0.13	TSA	96.08±0.33	1.64±0.14	34.65±1.21	8.33±0.08	24.91±0.19
Salatalık (<i>cucumber</i>)	TSA	0.25±0.01	7.94±0.02	TSA	51.26±0.29	0.68±0.05	15.14±0.18	6.05±0.05	33.43±0.17
Kereviz (<i>celery</i>)	TSA	TSA	10.51±0.12	TSA	240.13±2.20	1.27±0.12	19.85±0.20	3.59±0.05	21.79±0.20
KED (Anonymous, 2002).	0.05-0.2	0.2	0.01-50	-	0.2-25	0.02-3	-	-	2-50

TSA: Tayın sınırı altında (*Below the limit of quantification*)

KED: Kabul edilebilir en yüksek derişim (*Maximum acceptable concentration*)

^a Ortalama ± Standart sapma (*Mean ± Standard deviation*)

Kadmiyumun vücuttaki çeşitli enzimleri etkilediği bilinmektedir. Yiyecek alımı ve tütün kullanımı, Cd'nin vücuda girdiği ana yollardır. Kadmiyum insan vücudunda birikebilen ve böbrek fonksiyon bozukluğu, iskelet sistemi hasarları vb. ciddi sağlık sorunlarına sebep olan toksik bir elementtir (Manahan, 2003). Çeşitli sebzeler ve meyvelerde Cd için sınır değer Türk Gıda Kodeksinde 0.05-0.2 mg/kg aralığında değişmektedir (Anonymous, 2002). Meyve örneklerinde Cd, tayin sınırından daha düşük seviyelerde olması sebebiyle tespit edilemedi. Sebze örneklerinde sadece ıspanak (0.10 mg/kg), tere (0.06 mg/kg), roka (0.27 mg/kg), biber (0.08 mg/kg) ve mantarda (0.04 mg/kg) tespit edildi.

Kobalt, beslenmede oldukça önem taşıyan bir elementtir. Kobalt, B12 vitamininin merkez yapı taşıdır. Bugüne kadar bilinen en etkili biyokatalizördür. Kobalt eksikliğinde anemi riski artar. Kobalt başlıca karaciğer ve sakatatlar, kırmızı et, istiridye ve balıkta bulunur. Kobalt hayvansal besinlerde daha çok bulunur (Tezcan ve Tezcan, 2007). Kobalt için Türk Gıda Kodeksindeki bira ve alkolsüz biralara için sınır değer belirtilmiş ve bu sınır değer 0.2 mg/kg'dır (Anonymous, 2002). Sebze ve meyve örnekleri için herhangi bir sınır değer belirtilmemektedir. 0.2 mg/kg sınır değer kabul edilirse, kobalt pazı (0.34 mg/kg), roka (0.36 mg/kg), kabak (0.37 mg/kg), bakla (0.37 mg/kg), taze fasulye (0.35 mg/kg), taze soğan (0.40 mg/kg), maydanoz (0.34 mg/kg) ve salatalıkta (0.25 mg/kg) yüksek olarak bulundu.

Bakır, hem bitkilerin hem de hayvanların büyümesinde gerekli olan temel bir mikro besin maddesidir. Bakır birçok enzimin fonksiyonunu ve kalp çalışmasını düzenler. İnsanlarda, kan hemoglobinin üretiminde yardımcı olur. Bakır yüksek dozlarda anemi, karaciğer ve böbrek hasarı, mide ve bağırsak tahrişine neden olabilir. Bakır vücut tarafından emilimi zor olan bir elementtir. Besinlerdeki bakırın ancak %5'i vücut tarafından alınabilir. Bakır eksikliği kansızlık ve kemik yapısında bozukluklarla kendini gösterir (Martinez ve Motto, 2000). Bakır en düşük taze soğanda (1.75 mg/kg), en yüksek mantarda (25.05 mg/kg) tespit edildi. Bakır için Türk Gıda

Kodeksindeki sınır değerler 0.01-50 mg/kg aralığında değişmektedir (Anonymous, 2002). Bakır tüm sebze ve meyvelerde tespit edilmekle birlikte 50 mg/kg üst sınırını aşmadığı tespit edildi.

Krom(III), insülin çalışmasını güçlendirir ve böylece karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını da düzenler. Bununla birlikte, krom(VI) kanserojendir (Scragg, 2006). Krom için Türk Gıda Kodeksinde herhangi bir sınır değer belirtilmemiştir (Anonymous, 2002). Krom hiçbir sebze örneğinde tespit edilemezken, meyve örneklerinden sadece ayva (0.33 mg/kg), armut (0.10 mg/kg), mandalina (0.17 mg/kg) ve çilekte (0.17 mg/kg) tespit edildi.

Demirin vücut çalışmasındaki başlıca işlevi oksijen taşınması ile ilgilidir. Demir bitkilerde sadece demir(III) halinde bulunurken hayvansal gıdalarda demirin %60'ı demir(II), %40'ı ise demir(III) halindedir. Vücudumuzda demir, demir(II) halinde bulunduğu daha fazla emilim olmaktadır. Asitli ortam demir(III) iyonlarını demir(II) iyonlarına indirger (Tezcan ve Tezcan, 2007). Demir için Türk Gıda Kodeksinde sınır değerler 0.2-25 ppm olarak verilmektedir (Anonymous, 2002). Demir en yüksek ıspanak (353.26 mg/kg), tere (247.85 mg/kg), pazı (384.13 mg/kg), roka (554.86 mg/kg), ısırgan otu (288.60 mg/kg), dereotu (173.48 mg/kg) ve kereviz (240.13 mg/kg) gibi yeşil yapraklı sebzelerde bulundu. Meyvelerdeki demir derişimleri sebzelere göre daha düşük bulundu.

Kurşun esansiyel bir element değildir. Toksik olduğu iyi bilinmektedir ve etkileri diğer eser metallerin etkilerinden daha kapsamlı olarak ele alınmaktadır. Kurşun, beyin, sinir sistemi, kırmızı kan hücreleri ve böbreklerde ciddi yaralanmalara neden olabilir (Baldwin ve Marshall, 1999). Türk Gıda Kodeksinde kurşun için sınır değerler farklı gıdalar için 0.02- 3 mg/kg aralığında değişiklik göstermektedir (Anonymous, 2002). Kurşun en yüksek tere (2.19 mg/kg), roka (2.08 mg/kg) ve baklada (2.5 mg/kg) bulundu. Burada kurşun için bulunan sonuçlar sınır değerlerin altındadır.

Mangan, vücutta çeşitli metabolik süreçleri kolaylaştıran bir koenzim olarak çalışır. Kemik oluşumu, tiroid fonksiyonu, kalsiyum emilimi, kan şekeri düzenlenmesi, bağışıklık fonksiyonu, yağ ve karbonhidrat metabolizmasında rol oynamaktadır. Mangan için Türk Gıda Kodeksinde herhangi bir sınır değer belirtilmemiştir (Anonymous, 2002). Mangan toksisitesi düşük bir element olarak bilinmektedir. Mangan en yüksek ıspanak, pazı, roka, ısırgan otu, marul, dereotu ve maydanozda bulundu. Meyvelerde sebzelere göre daha az bulunmakla birlikte en yüksek çilek, çagla ve kestanede bulundu.

Nikel, esansiyel element olmakla birlikte yüksek derişimlerde tehlikeli olabilmektedir. İnsanlarda kanserojen etki göstermekte, deride alerjik reaksiyon yanında solunum sistemine zarar verebilmektedir (Khodadoust ve ark., 2004). Nikel için Türk Gıda Kodeksinde sebzeler ve meyveler için herhangi bir sınır değer belirtilmemektedir (Anonymous, 2002). Nikel en yüksek havuç (10.18 mg/kg), kabak (16.84 mg/kg) ve marul (14.77 mg/kg) örneklerinde tespit edildi. Meyvelerde ise kivi (8.00 mg/kg) ve çagla (6.72 mg/kg) örneklerinde diğer örneklere göre daha yüksek derişimlerde tespit edildi.

İçme suyu ve birçok gıda maddesi belirli derişimlerde çinko içerir. Çinko, 300' den fazla enzim ve protein için gerekli bir metaldir. Çinko immün sistem için esansiyel bir eser elementtir.

Çinko eksikliği sendromu, anemi, deri farklılaşmaları, büyüme ve mental gerilik olarak kendini gösterir (Greany, 2005). Çinko için Türk Gıda Kodeksinde sınır değerler 2-50 mg/kg aralığında değişmektedir (Anonymous, 2002). Çinkonun hemen hemen tüm sebzelerde bol olarak bulunduğu tespit edildi. Sebze de bulunan çinko derişimleri 50 mg/kg üst sınırını aşmamakla birlikte, meyvelerde daha az bulundu.

BCR 191-liyofilize edilmiş esmer ekmek standart referans maddesinde, kadmiyum, bakır, demir, kurşun, mangan ve çinko derişimlerinin belirlenmesiyle sonuçların doğruluğu gösterildi. Standart referans maddenin çözünürleştirilmesinde sebze ve meyveler için uygulanan aynı yöntem kullanılarak çözünürleştirildi. Standart referans madde için kadmiyum, bakır, demir, kurşun, mangan ve çinko elementlerinin onaylanmış değerleri ile bu elementler için bulunan derişimleri Çizelge 3'de verilmektedir. Bu sonuçlar incelenen elementlerin bağıl standart sapmaları % 10.3'den az ve onaylanmış derişimleri ile uyumlu olarak bulundu. ICP OES ile analizlenen elementler için gözlenebilir sınır değerleri, Cd için 0.45 µg/kg, Co için 1.52 µg/kg, Cu için 1.80 µg/kg, Cr için 4.51 µg/kg, Fe için 3.64 µg/kg, Pb için 14.77 µg/kg, Mn için 0.29 µg/kg, Ni için 3.32 µg/kg ve Zn için 3.12 µg/kg olarak bulundu.

Çizelge 3. Standart referans maddede (BCR 191-liyofilize edilmiş esmer ekmek) sertifikada bildirilen ve ölçülen element derişimleri (µg/kg)

Table 3. Certified and measured elemental concentrations (µg/kg) in standard reference material (BCR 191-lyophilised brown bread)

Element	(Element)	Sertifikada bildirilen değer (Certified value)	Ölçülen değer (Measured value)	% Bağıl hata, (Relative error %)	% Bağıl standart sapma (Relative standard deviation %)
Kadmiyum	(Cadmium)	28.4 ± 1.4 ^a	30.2 ± 2.8	6.3	9.3
Kurşun	(Lead)	187 ± 14	205 ± 21	9.6	10.2
Bakır	(Copper)	2.63 ± 0.07	2.9 ± 0.3	10.3	10.3
Çinko	(Zinc)	19.5 ± 0.5	21.0 ± 1.3	7.7	6.2
Demir	(Iron)	40.7 ± 2.3	45.2 ± 3.8	11.1	8.4
Mangan	(Manganese)	20.3 ± 0.7	21.6 ± 0.9	6.4	4.2

^a Ortalama ± Standart sapma

(^a Mean ± Standard deviation)

SONUÇLAR

Bu çalışmada Aydın'da tüketilen 25 adet sebze ve 11 adet meyve örneğinin eser element derişimleri tespit edildi. Bu sebzeler ve meyveler bol miktarda demir, çinko, mangan, bakır ve kobalt içermektedir ve günlük karşılama dozunun önemli bir kısmını karşılamaaktadırlar. Genel olarak Aydın'da tüketilen sebze ve meyvelerde ağır metal derişimleri insan sağlığı için risk oluşturabilecek derişimlerde bulunmadı. Kadmiyum ve kurşun gibi toksik elementler için elde edilen sonuçların Türk Gıda Kodeksindeki sınır değerleri aşmadığı tespit edildi. Eser elementlerin ve ağır metallerin düzenli analizleri halk sağlığı açısından tüm gıda örneklerine uygulanmalı ve gıda güvenliği sağlanmalıdır.

TEŞEKKÜR

Yazar, rehberliği ve yardımları için Prof. Dr. Mustafa DEMİR'e, örneklerin toplanmasındaki yardımlarından dolayı lisans öğrencileri Osman BURGAZ ve Rıdvan AKSOY'a teşekkür eder.

KAYNAKLAR

Anonymous (2002). Türk gıda kodeksi. Gıda maddelerinde belirli bulaşanların maksimum seviyelerinin belirlenmesi hakkında tebliğ (2002/63). 23 Eylül 2002 tarih ve 24885 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Baldwin, D.R., Marshall, W.J. (1999). Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Ann Clin Biochem*, 36(3): 267–300.

Baykal, H., Baykal, T. (2008). Küreselleşen Dünya'da Çevre Sorunları/Environmental Problems in A Globalized World. *Mustafa Kemal Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 5(9): 1-17.

Celik, U., Oehlenschlager, J. (2007). High contents of cadmium, lead, zinc and copper in popular fishery products sold in Turkish supermarkets. *Food Control*, 18: 258–261.

Divrikli, U., Saracoglu, S., Soylak, M., Elci, L. (2003). Determination of trace heavy metal contents of green vegetables samples from Kayseri-Turkey by flame atomic absorption spectrometry. *Fresenius Environ Bull*, 12: 1123-1125.

D'Mello, J.P.F. (2003). *Food safety: Contaminants and toxins*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, Cambridge, MA, 480 p.

De Santis D., Moresi M. (2007). Production of alizarin extracts from *Rubia tinctorum* and assessment of their dyeing properties. *Ind Crop Prod*, 26: 151-162.

Dundar, M.S., Sağlam, H.B. (2004). Determination of Cd and vanadium in tea varieties and their infusions in comparison with 2 infusion processes. *Trace Elem Electrolytes*, 21(2): 60-63.

Duran, A., Tuzen, M., Soylak, M. (2008). Trace element levels in some dried fruit samples from Turkey. *Int J Food Sci Nutr*, 59(7-8): 581-589.

Falandysz, J., Frankowska, A., Mazur, A. (2007). Mercury and its bioconcentration factors in King Bolete (*Boletus edulis*). *Bull. Fr., J Environ Sci Health Part A*, 42(14): 2089–2095.

Greany, K. M. (2005). An assessment of heavy metal contamination in the marine sediments of Las Perlas Archipelago, Gulf of Panama, M.S. thesis, School of Life Sciences Heriot-Watt University, Edinburgh, Scotland, 114 p.

Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull*, 68(1): 167–182.

Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G. (2008). Health risk of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with waste water in Beijing, China. *Environ Pollut*, 152(3): 686–692.

Khodadoust, A. P., Reddy, K. R., Maturi, K. (2004). Removal of nickel and phenanthrene from kaolin soil using different extractants. *Environ Eng Sci*, 21(6): 691–704.

Manahan, S.E. (2003). *Toxicological chemistry and biochemistry*, CRC Press, Limited Liability Company (LLC), 3rd edition, 424 p.

Martinez, C. E., Motto, H. L. (2000). Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils, *Environ Pollut*, 107(1) 153–158.

Munoz-Olivas, R., Camara, C., (2001). Speciation related to human health. In: Ebdon, L., Pitts, L., Cornelis, R., Crews, H., Donard, O.F.X.,

- Quevauviller, P. (Ed), *Trace element speciation for environment, food and health*. The Royal Society of Chemistry, 331-353 p.
- Radwan, M.A., Salama, A.K. (2006). Market basket survey for some heavy metals in Egyptian fruits and vegetables. *Food Chem Toxicol*, 44(8): 1273–1278.
- Saracoglu, S., Saygi, K.O., Uluozlu, O.D., Tuzen, M., Soylak, M. (2007). Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. *Food Chem*, 105(1), 280-285.
- Sathawara, N.G., Parikh, D.J., Agarwal, Y.K. (2004). Essential heavy metals in environmental samples from western India. *Bull Environ Contam Toxicol*, 73(4): 756–761.
- Scragg, A. (2006). *Environmental biotechnology*, Oxford University Press, Oxford, UK, 2nd edition, 105 p.
- Shaheen, N., Irfan, N.M., Khan, I.N., Islam, S., Islam, M.S., Ahmed, M.K. (2016). Presence of heavy metals in fruits and vegetables: Health risk implications in Bangladesh. *Chemosphere*, 152: 431-438.
- Tezcan, R. ve Tezcan, H. (2007). *Metaller kimyası*. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 288 p.
- Tuzen, M. (2003). Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chem*, 80(1): 119–123.
- Tuzen, M., Saracoglu, S., Soylak, M. (2008). Evaluation of trace element contents of powdered beverages from Turkey. *J Food Nutr Res*, 47(3): 120-124.
- Wang, X., Sato, T., Xing, B., Tao, S. (2005). Health risk of heavy metals to the general public in Tianjan, China via consumption of vegetables and fish. *Sci Total Environ*, 350 (1–3): 28–37.
- Yusuf, A.A., Arowolo, T.A., Bamgbose, O. (2003). Cadmium, copper and nickel levels in vegetables from industrial and residential areas of Lagos City, Nigeria. *Food Chem Toxicol*, 41(3): 375-378.

PRELIMINARY INVESTIGATIONS *IN VITRO* ACE-INHIBITORY ACTIVITIES OF TRYPTIC PEPTIDES PRODUCED FROM COLD PRESS DEOILED HAZELNUT MEALS

İbrahim Gülseren^{1*}, Bilal Çakır^{2,3}, Ahmet Furkan Çağlar¹

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), Küçükçekmece, İstanbul, Turkey

²İstanbul Sabahattin Zaim University (İZÜ), Halal Food R&D Center, Küçükçekmece, İstanbul, Turkey.

³Marmara University, Institute of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Biochemistry, Maltepe, İstanbul, Turkey.

Received/Geliş: 19.12.2018; Accepted/Kabul: 17.03.2019; Published online/Online baskı: 22.03.2019

Gülseren, İ. Çakır, B., Çağlar, A.F. (2019). Preliminary investigations *in vitro* ace-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals. *GIDA* (2019) 44 (2): 309-317 doi: 10.15237/gida.GD18125

Gülseren, İ. Çakır, B., Çağlar, A.F. (2019). Soğuk pres fındık posalarından üretilmiş triptik peptitlerin *in vitro* ace inhibe edici aktiviteleri üzerine ön incelemeler. *GIDA* (2019) 44 (2): 309-317 doi:10.15237/gida.GD18125

ABSTRACT

Hazelnut (*Corylus avellana* L.) is a rich source of proteins which are concentrated in deoiled meals during hazelnut oil manufacture. Here, an *in vitro* attempt was made to evaluate the biological functionality of tryptic hazelnut peptides. In our *in silico* investigations, a specific subset of hazelnut proteins was predicted to demonstrate ACE-inhibitory and DPP-IV-inhibitory activities. Consequently, hazelnut protein concentrates were produced from cold press deoiled meals and subjected to tryptic hydrolysis (37°C). The progress of trypsinolysis was monitored using size exclusion chromatography (SEC), fast protein liquid chromatography (FPLC) and Raman spectroscopy. While the protein hydrolyzates had limited ACE-inhibitory activity, after 240 min of trypsinolysis, ACE-inhibitory activity was approximately 40% at a relatively low protein concentration level. Although further clarifications are necessary, current findings demonstrated hazelnut meal could be considered as a valuable source of ACE-inhibitory peptides that can be utilized in the formulation of functional foods and food supplements.

Keywords: Cold press meals; plant protein peptides; common hazelnut (*Corylus avellana* L.); trypsinolysis; ACE-inhibition.

SOĞUK PRES FINDIK POSALARINDAN ÜRETİLMİŞ TRİPTİK PEPTİTLERİN *IN VITRO* ACE İNHİBE EDİCİ AKTİVİTELERİ ÜZERİNE ÖN İNCELEMELER

ÖZ

Fındık (*Corylus avellana* L.) proteince zengin bir kaynaktır ve soğuk pres fındık yağı üretimi sürecinde oluşan fındık posaları proteince de zenginleşmektedir. Bu çalışmada, triptik fındık peptitlerinin biyolojik fonksiyonlarını değerlendirmek için *in vitro* analizlerde bulunulmuştur. Grubumuzun önceki çalışmalarında, *in silico* yöntemlerle fındık peptitlerinin biyoaktivitelerini incelemek için fındık proteinlerinin spesifik bir alt kümesi incelenmiş ve ACE- ve DPP-IV-önleyici aktivitelerin varlığı öngörülmüştür. Bu bulgulara bağlı olarak, soğuk pres yönteminde ortaya çıkan fındık posalarından, fındık proteini konsantreleri üretilmiş ve bu konsantreler triptik hidrolize (37°C) tabi tutulmuştur. Tripsinoliz prosesi, boyutsal ayırım kromatografisi (SEC), hızlı protein sıvı kromatografisi (FPLC) ve Raman spektroskopisi kullanılarak takip edilmiştir. Enzimatik muamele görmemiş protein konsantrelerinin sınırlı ACE inhibe edici aktivitesi varken, 240 dakikalık tripsinolizde oluşan peptitlerin ACE-inhibitör aktivitesi, düşük protein konsantrasyonlarında dahi yaklaşık %40 düzeyinde gerçekleşmiştir. Mevcut bulgular, fındık posasının ACE-inhibitör peptitler açısından önemli bir kaynak olarak değerlendirilebileceğini ve fındık posasından hidrolizatlarının fonksiyonel gıdaların ve gıda takviyelerinin formülasyonunda kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Soğuk pres posaları; bitki proteini peptitleri; fındık (*Corylus avellana* L.); tripsinoliz; ACE-inhibisyonu.

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ ibrahim.gulseren@izu.edu.tr,

☎ (+90) 212 692 9619,

(+90) 212 693 9758

INTRODUCTION

Due to the ever increasing global demand for proteins, affordable and high quality protein products are highly sought after. Consequently plant proteins represent a sustainable source of proteins for human diets. Since the conversion efficiency of plant proteins to animal proteins is fairly poor (approximately 15%) (Day, 2013), it makes perfect sense to search for alternative ways to utilize plant proteins in foods and other consumer products. Consequently, one of the research priorities in our group is the valorization of cold press and other oil processing by-products (i.e., deoiled meals of oil fruits and oil seeds) with the aim of generating a variety of economic plant protein products and their corresponding hydrolyzates. Since protein content in oilseeds and oil fruits is relatively high and proteins are further concentrated upon deoiling, they represent a reasonably economic and sustainable resource for protein manufacture.

Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) are among the major agricultural products of Turkey, where approximately 80% of the global production is carried out (roughly 550,000 tonnes per year) (Ozdemir and Akinci, 2004), while the other major producers include other Mediterranean countries and western USA. Hazelnuts are rich in oil content (approx. 60%) and known to demonstrate various bioactivities including their cardioprotective effects. This effect is possibly due to the mono- and polyunsaturated fatty acids in the hazelnuts (Parcerisa et al., 1997). Other bioactive compounds of the hazelnuts include polyphenols, tocopherols and squalene (Alasalvar et al., 2006, 2009; Dogan et al. 2007). According to Miraliakbari and Shahidi (2008), phytosterols and phytostanols contribute to the cholesterol lowering and antioxidant properties of hazelnuts.

Industrial production of cold press hazelnut oil is also increasing which means the deoiled meal represents an increasing potential of valorization. According to the data provided by Alphan et al. (1996), it is possible to anticipate up to 45% proteins in the meal. Although there is some data on the technical functionality of hazelnut proteins (Tatar et al., 2015), the data on possible bioactive

characteristics of hazelnut proteins (Aydemir et al., 2014) and their hydrolyzates are truly scarce. Most of the literature related to the hazelnut proteins so far focused heavily on the reduction of food allergies (Ortolani et al., 2000; Vieths et al., 1999; Flinterman et al., 2008). It is noteworthy that the relative digestive stability of hazelnut allergens were found to be lower compared to peanut allergens (Vieths et al., 1999).

Bioactive peptides may form during the processing or digestion of protein-containing foods (Vermeirssen et al., 2004). Furthermore, using proteases, bioactive peptides can be produced by breaking down food proteins *in vitro*. Enzymatic preparation of bioactive peptides are highly advantageous since the use of toxic chemicals and organic solvents can be avoided and the final products are suitable for use in food, cosmetics and pharmaceutical products (Agyei and Danquah, 2011), while the demonstration of a variety of bioactivities including anti-oxidative, anti-carcinogenic, antimicrobial activities as well as ACE-inhibition activities can also be possible.

In our previous studies, an attempt to predict the potential bioactivities of peptides generated from hazelnut proteins was made *in silico* and a specific subset of hazelnut proteins was predicted to primarily demonstrate ACE-inhibitory and DPP-IV-inhibitory activities, while anti-oxidative activity was a much less likely third category (Gülseren, 2018).

Angiotension I-converting enzyme (ACE) converts angiotensin I to angiotensin II, which is a vasoconstrictor. Also, ACE hydrolyzes bradykinin, which is a vasodilator peptide. Consequently, ACE action elevates blood pressure in humans (Vermeirssen et al., 2004; Hartmann and Meisel, 2007). ACE-inhibitory peptides have the capabilities of reducing blood pressure and the likelihood of hypertension (Vermeirssen et al., 2004). Although bioactive peptides are usually not as efficient as synthetic drug molecules, due to the absence of pronounced side effects, they can conveniently be utilized in functional foods or food supplements (Li et al., 2005). Furthermore, it is thought that the

rate of bioactive peptide removal from the body is lower than that of synthetic drugs and the affinity to tissues is higher (Erdmann et al., 2008).

In this study, a further attempt was carried out in order to investigate the ACE-inhibition characteristics of tryptic hazelnut peptides *in vitro*. Due to the promising results presented here, a comprehensive study on the influence of various proteases on bioactivities and allergenic characteristics of hazelnut proteins is currently being executed.

MATERIALS and METHODS

Production of protein concentrates

Cold press deoiled hazelnut meal samples were generously donated by Oneva (Neva Foods Ltd., İstanbul, Turkey), a local manufacturer of cold press oils. In all cases, the maximum temperature observed by the cold press samples was lower than 40°C. All chemicals used were of reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

Protein extraction was based on the alkaline extraction-isoelectric precipitation (AE-IP) method. In this technique, firstly, solubilization of protein molecules at basic pH is carried out, which was followed by the isoelectric precipitation at acidic pH values (Boye et al. 2010). Briefly, 50 g of deoiled meal was dispersed in water (1:15, w/v) and the pH of the medium was adjusted to pH 9.5 using 1.0 N NaOH. The dispersions were kept stirred at 500 rpm at ambient temperature ($22\pm 1^\circ\text{C}$) for 2 h to facilitate hydration. Immediately afterwards, the dispersions were centrifuged at $10000\times g$ for 15 min at 4 °C using a CR22N high-speed refrigerated centrifuge (Hitachi Koki Co., Ltd., Tokyo, Japan). The supernatant containing the solubilized proteins was collected and the medium pH was adjusted to pH 4.5 in order to induce isoelectric precipitation. To ensure the completion of protein precipitation, the supernatant was once again centrifuged at identical conditions. The pellet was collected and immediately frozen at -20°C . Frozen samples were lyophilized using a Teknosem TRS 2/2V freeze drier (Teknosem Corp., İstanbul, Turkey).

In vitro trypsinolysis

Trypsinolysis was carried out based on the previous literature (Gülseren and Corredig, 2013). An aqueous dispersion of the protein concentrate was prepared in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7) at a protein concentration level of 1% by stirring for 1 h. Trypsin was obtained from Sigma Aldrich Corp. (T1426). Tryptic digestion was carried out for 2 h at an enzyme to protein ratio of 1:1000 (w/w) on a thermomixer (MIULAB Thermo Shaker Incubator, 37°C, 1000 rpm). Immediately afterwards, the digest was heated to 95°C and held at this temperature for 5 min. The samples were rapidly cooled using ice. Upon reaching the ambient temperature, the samples were centrifuged for 30 min at $5000\times g$ to remove insoluble aggregates. Prior to chromatographic analysis, all samples were filtered through 0.45 µm PTFE syringe filters (Isolab, Germany).

Size exclusion chromatography (SEC)

In order to monitor the progress of trypsinolysis, size exclusion chromatography was utilized on a Shimadzu LC-20AD HPLC system (Shimadzu Scientific Instruments) which consisted of a pump, thermostated column compartment and photodiode array detector. Immediately after trypsinolysis, the molecular size distribution of the partially hydrolyzed peptides were analyzed using a desalting column (HiTrap™ desalting column, Product No: 17-408-01, GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The column equilibration and elution buffer was 50 mM phosphate buffer (pH 7) which contained 0.5 M NaCl. An isocratic flow was utilized (1 ml/min and 40°C). The detection wavelength was 214 nm. As a molecular size reference, a standardized BSA solution was used (Product No: P5619, Sigma-Aldrich Corp).

Fast protein liquid chromatography (FPLC)

Hazelnut proteins and their corresponding peptides were also analyzed using AKTA - Pure FPLC System (GE). In order to facilitate separation, 1 ml HiTrap DEAE FF anion exchange columns (GE) were utilized. Analysis was carried out for 40 column volumes (CV) using 50 mM Tris-HCl buffer as the eluent (pH 8.5), while a NaCl gradient (0-0.6 M) to ensure fractionation. UV detection was carried out at 280 nm.

Raman spectroscopy

Raman spectroscopy was carried out using a Rigaku Progeny X2 instrument. The spectral range was 200 – 2000 1/cm, while the spectral resolution was 7 – 10 1/cm. TE cooled CCD detection was used at a wavelength of 785 nm. BSA reference solution was utilized for comparative purposes.

Measurement of ACE inhibitory activity

All the solutions and reactants used in this assay were prepared in 100 mM sodium borate buffer (pH 8.3). ACE-inhibition assay was carried out based on the method described by Sheih et al. (2009) with slight modifications. 200 µl of 5 mM HHL substrate (N-Hippuryl-His-Leu hydrate) was mixed with peptide dispersions prepared by trypsinolysis. The mixture was incubated at 37°C for 10 min. Immediately afterwards, 20 µl of concentrated trypsin solution was added to generate an enzyme concentration of 1.68 mU in the mixture. The incubation was carried out for 0-4 h at 37°C and stopped by the addition of 250 µl HCl (1 M). The final mixture was injected into the HPLC device for the determination of hippuric acid (Sheih et al., 2009). Ascentis C18 Column (4.6 mm ID × 250 mm, Supelco) with a particle diameter of 5 µm was used in the analysis. The mobile phase was composed of 1:1 mixture of ethanol and water by volume containing 1 ml/L TFA. The absorbance was detected at 228 nm. The analysis was carried out at 40°C at a flow rate of 1 ml/min. In order to determine % ACE inhibition, the performance of the peptide samples was compared to the blank sample (i.e.,

water was added instead of peptide dispersion). 0.02% sodium azide was added to all samples and solutions as a bacteriostatic in all cases.

Statistical analysis

Data were presented as the means ± standard deviations from at least triplicate experiments in all cases. The differences between samples were also evaluated based on statistical significance ($P < 0.05$). Statistical significance was determined based on ANOVA tests.

RESULTS and DISCUSSION

Firstly, using a thermomixer, trypsinolysis of hazelnut protein concentrates was carried out at 37°C at an enzyme: substrate ratio of 1:1000. The progress in hydrolysis (0-4 h) was monitored based on size exclusion chromatography (Figure 1). As time passed, the peaks slightly shifted to the right-hand side of the spectrum indicating that there were smaller moieties in the samples due to enzymatic hydrolysis. Since the total number of moles in the system might have increased and some of the peptide bonds (i.e., 214 nm detection) became more detectable, in some cases the total peak area significantly increased as well. Variations in the molar extinction coefficients could also lead to this observation. As trypsinolysis took place, an increasing extent of smaller peptides were observed. Furthermore, UV absorbance values decreased with hydrolysis time as previously observed by De Gobba et al. (2014).

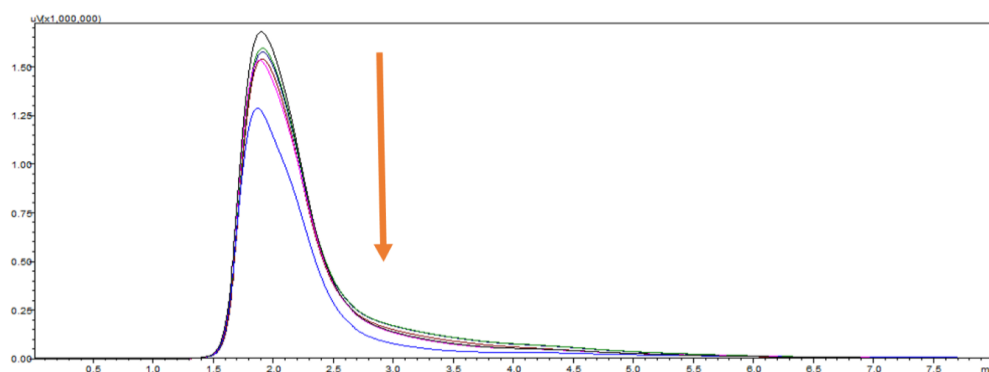


Figure 1. Size exclusion chromatography (SEC) analysis of trypsin treated hazelnut protein concentrates. Time of hydrolysis (0-240 min) increased in the direction of the arrow. Every curve represented a single time point in trypsinolysis (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min).

To further illustrate the differences between the untreated protein concentrates and trypsin treated samples (4 h), FPLC was utilized (Figure 2). Using an anion exchange column and a linear gradient of NaCl (0-0.6 M) for 40 column volumes (CV), untreated and trypsin treated protein concentrates were analyzed. Figure 2 demonstrated the differences between the two samples clearly pointing out that trypsinolysis took place. In the hydrolyzed sample, a number of new peaks were found to exist. Previously, it was shown that FPLC approach can be utilized in the

fractionation of bioactive peptides and evaluation of their bioactivities including ACE-inhibitory characteristics (Kapel et al., 2006). The values for UV absorbance decreased considerably due to the formation of the new peaks which corresponded to the formation of new peptide fractions. While unbound fractions were detected rapidly prior to the salt gradient, the increasing salt concentrations enabled the elution of various bound fractions.

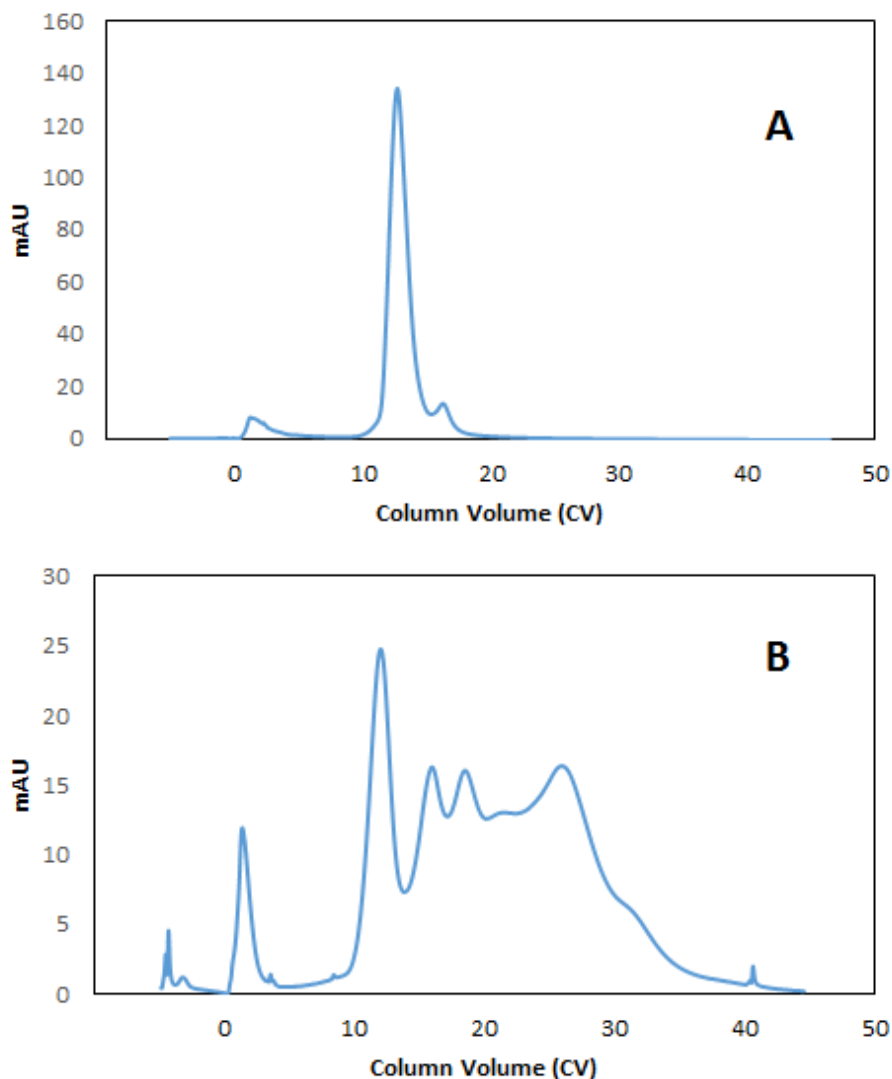


Figure 2. Elution of (A) untreated and (B) trypsin treated hazelnut protein concentrates based on anion exchange separation. Conductivity data was plotted as a function of column volume (0-40 CV).

In order to confirm the data obtained from HPLC-SEC and FPLC analyses, Raman spectroscopy was utilized in the analysis of identical samples (Figure 3). BSA was added as a reference protein to this measurement. Firstly, at all levels of trypsinolysis, the main features in the spectrum were Amide I and III bands and C-C bands. In most cases while the duration of enzymatic treatment increased, the intensity of these bands became more intense possibly indicating that amide bands were more available for detection due to hydrolysis of the proteins.

Amide I band is generally characterized by C-O bond stretching and N-H bond bending in peptides and proteins. In addition, its intensity is

a measure of the presence of α -helical proteins. Increase in the intensity of this band could point out to the fact that during trypsinolysis α -helical content increased for the current samples. Meanwhile Amide III band is characterized by C-N bond stretching and N-H bond bending (Li-Chan, 1996; Herrero et al., 2008a, b). Based on the changes in Amide III band, it might be possible to hypothesize that structural changes including secondary and tertiary level took place due to enzymatic hydrolysis. This could possibly be influential on the biological and technical functionality of the proteins as well, such as their water and/or oil binding, solubility, and hydrophilicity/hydrophobicity characteristics (Herrero et al., 2008a,b).

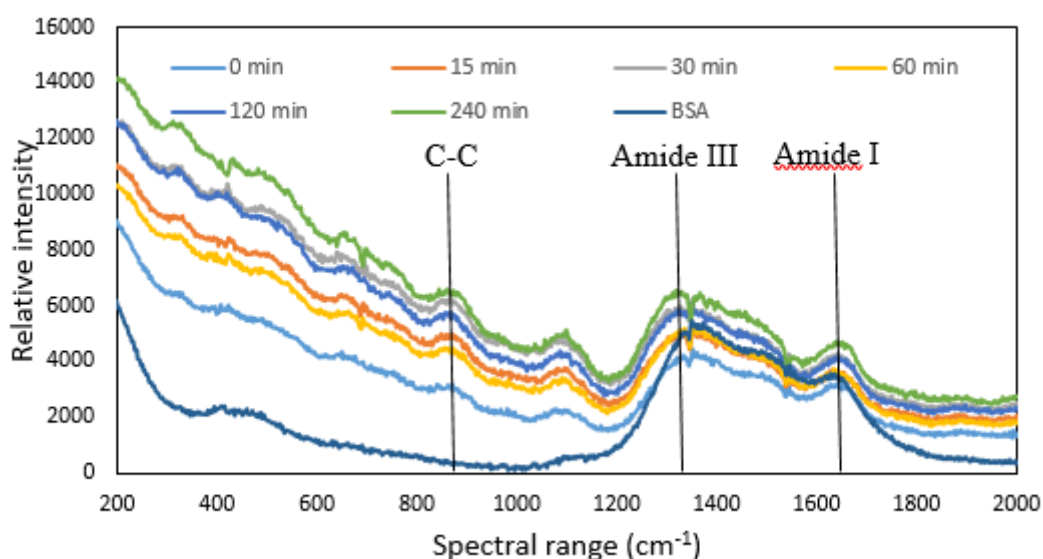


Figure 3. Raman spectroscopy analysis of trypsin treated hazelnut protein concentrates. Enzymatic digestion was carried out at 37°C at an enzyme: substrate ratio of 1:1000 (w/w). In order to enhance the reproducibility, a thermomixer was utilized (1000 rpm). Every curve represented a single time point in trypsinolysis (0, 15, 30, 60, 120 and 240 min). Reference sample was BSA with no trypsin treatment.

Aliquots from tryptic digests studied in the SEC, FPLC and Raman experiments were collected and further investigated in the ACE-inhibition assays (Figure 4). Although small, the untreated protein concentrate demonstrated a limited extent of ACE-inhibitory activity (7.6%). With the increasing extent of hydrolysis (Figures 1), the extent of ACE-inhibitory activity also increased

and reached to about 40% inhibition after 4 h of trypsinolysis (Figure 4). These findings were coherent with our previous findings since most of the ACE-inhibitory peptides were predicted to be di- or tripeptides (Gülseren, 2018), for which becoming dominant in the system might require extended treatments. In the literature, Teh et al. (2016) demonstrated that ACE-inhibitory

activities of hemp protein hydrolysates treated with various proteases generally increased with enzymatic treatment durations up to 4 h. Current data were coherent with these earlier findings, whereas the extent of increase in ACE-inhibitory activities of pinto bean protein hydrolysates were found to be limited beyond 1 h when treated with subtilisins (Garcia-Mora et al., 2015).

All the treatments induced statistically significant differences in ACE inhibition compared to the controls ($P < 0.05$). At the same level, all the treatments also demonstrated significant

differences from each other with the exception of 30 and 60 min samples, which were statistically similar. However, these samples differed from both other treatments and control samples as well ($P < 0.05$). Based on the current results, hazelnut meal could be considered as a valuable source of ACE-inhibitory peptides, and hazelnut consumption could lead to cardioprotective effects due to the combined effects of both its oil and protein fractions. Meanwhile the potential influence of hazelnut proteins and peptides on other bioactivities remain largely unexplored.

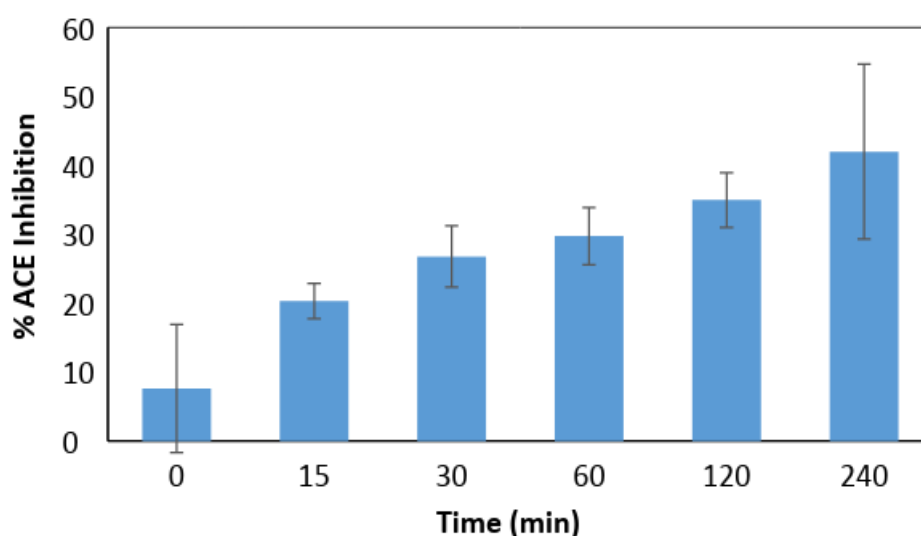


Figure 4. % ACE inhibitory activity of tryptic peptides from the hazelnut protein concentrates as a function of time. % Inhibition was calculated in comparison to a positive control where ACE activity was taken as 100%.

CONCLUSION

In this preliminary report, *in vitro* studies were carried out using hazelnut protein concentrates and a modest extent of ACE-inhibitory activities were detected for all aliquots withdrawn from the trypsinolysis experiments. % ACE-inhibition increased with the extent of trypsin treatment. While studies on other bioactivities remain unexplored so far, we are currently studying the influence of protein isolation methodologies, protein concentrations, and various proteases in order to fully elucidate the bioactive potential of

hazelnut peptides as well as identifying the cardioprotective proteins and peptides from the hazelnuts. Another concern is the reduction of allergenic effects during the enzymatic treatments, which could further enhance the chances of utilizing hazelnut peptides in food formulations. Circulatory system diseases are the primary cause of all death events in Turkey (approx. 40%) (Anonymous, 2015) and many other countries globally, which practically implies the cardioprotective potential of hazelnuts has to be fully exploited.

FUNDING

This work was supported by grants from TÜBİTAK 3501 and 1001 Programmes [grant number 115O569 - 2015-2017 and 217O063 – 2018-2020; The Scientific and Technological Research Council of Turkey]. The authors would like to also express their gratitude to Neva Foods Ltd. (İstanbul, Turkey) for the donation of the deoiled meals.

REFERENCES

- Agyei, D., Danquah, M.K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotech Adv.* 29(3): 272-277.
- Alasalvar, C., Amaral, J.S., Shadidi, F. (2006). Functional lipid characteristics of Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). *J Agric Food Chem.* 54: 10177-83.
- Alasalvar, C., Amaral, J.S., Satır, G., Shadidi, F. (2009). Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). *Food Chem.* 113: 919-925.
- Alphan, E., Pala, M., Açkurt, F., Yılmaz, T. (1996). Nutritional composition of hazelnuts and its effects on glucose and lipid metabolism. In: IV International Symposium on Hazelnut 445, 305-310, Ordu, Turkey.
- Anonymous (2000). Mortality rate statistics, (2014) (in Turkish). <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=18855>. Accessed on: August 2nd, 2017.
- Aydemir, L.Y., Gökbulut, A.A., Baran, Y., Yemenicioğlu, A. (2014). Bioactive, functional and edible film-forming properties of isolated hazelnut (*Corylus avellana* L.) meal proteins. *Food Hydrocoll.* 36: 130-142.
- Boye, J.I., Aksay, S., Roufik, S., Ribereau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rjamohamed, S.H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Res Int.* 43(2): 537-546.
- Day, L. (2013). Proteins from land plants—potential resources for human nutrition and food security. *Trends Food Sci. Technol.* 32(1): 25-42.
- De Gobba, C., Tompa, G., Otte, J. (2014). Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikekense*. *Food Chem.* 165: 205-215.
- Dogan, A., Siyakus, G., Severcan, F. (2007). FTIR spectroscopic characterization of irradiated hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Food Chem.* 100: 1106-14.
- Erdmann, K., Cheung, B.W., Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J Nutr Biochem.* 19(10): 643-654.
- Flinterman, A.E., Akkerdaas, J.H., Knulst, A.C., Van Ree, R., Pasmans, S.G. (2008). Hazelnut allergy: from pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 8(3): 261-265.
- Garcia-Mora, P., Frias, J., Peñas, E., Zielinski, H., Giménez-Bastida, J. A., Wiczowski, W., ... Martínez-Villaluenga, C. (2015). Simultaneous release of peptides and phenolics with antioxidant, ACE-inhibitory and anti-inflammatory activities from pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. pinto) proteins by subtilisins. *J Funct Foods.* 18: 319-332.
- Gülseren, İ. (2018). *In silico* methods to identify ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins. *J Food Meas Charact.* 12(4): 2607-14.
- Gülseren, İ., Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea polyphenol bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *J Agric Food Chem.* 61(13): 3242-51.
- Hartmann, R., Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* 18(2): 163-169.
- Herrero, A.M. (2008a). Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(6): 512-523.
- Herrero, A.M. (2008b). Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review. *Food Chem.* 107(4): 1642-51.

- Kapel, R., Rahhou, E., Lecouturier, D., Guillochon, D., Dhulster, P. (2006). Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochem.* 41(9): 1961-66.
- Li, G., Liu, H., Shi, Y., Le, G. (2005). Direct spectrophotometric measurement of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity for screening bioactive peptides. *J Pharm Biomed Anal.* 37: 219-224.
- Li-Chan, E.C Y. (1996). The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends Food Sci Technol.* 7: 361-370.
- Miraliakbari, H., Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chem.* 111(2): 421-427.
- Ortolani, C., Ballmer-Weber, B.K., Hansen, K.S., Ispano, M., Wüthrich, B., Bindslev-Jensen, C., et al. (2000). Hazelnut allergy: a double-blind, placebo-controlled food challenge multicenter study. *J Allergy Clin Immunol.* 105(3): 577-581.
- Ozdemir, F., Akinci, İ. (2004). Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut species. *J. Food Eng.* 63: 341-347.
- Parcerisa, J., Richardson, D.G., Magdalena, R., Codony, R., Boatella, J. (1997). Fatty acid distribution in polar and nonpolar lipid classes of hazelnut oil (*Corylus avellana* L.). *J Agric Food Chem.* 45: 3887-90.
- Sheih, I.C., Fang, T.J., Wu, T.K. (2009). Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem.* 115(1): 279-284.
- Tatar, F., Tunç, M.T., Kahyaoglu, T. (2015). Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) protein concentrates: functional and rheological properties. *J Food Sci Technol.* 52(2): 1024-31.
- Teh, S. S., Bekhit, A.E.D.A., Carne, A., Birch, J. (2016). Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain. *Food Chem.* 203: 199-206.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W. (2004). Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr.* 92: 357-366.
- Vieths, S., Reindl, J., Müller, U., Hoffmann, A., Haustein, D. (1999). Digestibility of peanut and hazelnut allergens investigated by a simple *in vitro* procedure. *Eur Food Res Technol.* 209(6): 379-388.

KIRMIZI PANCAR (*Beta vulgaris* L.) BETALAINLERİ ÜZERİNE TERMAL DESTEKLİ ULTRASONİK EKSTRAKSİYONUN ETKİSİ

Atilla ŞİMŞEK*

Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ordu, Türkiye

Geliş / Received: 07.01.2019; Kabul / Accepted: 14.02.2019; Online baskı / Published online: 23.03.2019

Şimşek, A. (2019). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.) betalainleri üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun etkisi. *GIDA* (2019) 44 (2): 318-327 doi: 10.15237/gida.GD19027

Şimşek, A. (2019). The effect of thermal assisted ultrasonic extraction on the red beetroot (*Beta vulgaris* L.) betalain. *GIDA* (2019) 44 (2): 318-327 doi: 10.15237/gida.GD19027

ÖZ

Bu çalışmada, kırmızı pancarın (*Beta vulgaris* L.) betalainlerinin ultrasonik banyoda, farklı sıcaklık ve sürelerde (40-80°C, 5-210 dk) değişimi incelenmiştir. Sıcaklık derecesi (I), süre (t) ve T_{xt} interaksiyonunun betalainler, toplam fenolik madde (TFM), DPPH radikal süpürme aktivitesi (DPPH-RSA), Hunter L, a ve b değerleri üzerine etkisi önemli ($P < 0.001$) bulunmuştur. Termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (TDUE), 60°C-40 dk ve 80°C-25 dk uygulamaları ile betalainlerin en yüksek değere ulaştığı, daha sonra artan sürelerin ise azalmalara neden olduğu belirlenmiştir. TDUE'nun 40°C uygulamasında ise betalainlerin yavaş artış gösterdiği fakat bu artışın diğer proseslere (60-80°C) ait değerlerin altında kaldığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan, betalainlerin değişiminin TFM, DPPH-RSA ve Hunter L, a ve b değeri değişimi ile ilişkili olduğu ve TDUE koşullarında elde edilen matematiksel eşitliklerin ($R^2 = \%84-87$), betalainlerdeki değişime ait optimum koşulları belirlemede kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Kırmızı pancar, *Beta vulgaris* L., betalainler, doğal renk maddeleri, ultrasonik ekstraksiyon

THE EFFECT OF THERMAL ASSISTED ULTRASONIC EXTRACTION ON THE RED BEETROOT (*Beta vulgaris* L.) BETALAINS

ABSTRACT

In this study, the change of red beet (*Beta vulgaris* L.) betalains was investigated in ultrasonic bath at different temperature and times (40-80°C, 5-210 min). The effect of temperature (I), time (t) and T_{xt} interaction on betalains, total phenolic matter (TFM), DPPH radical scavenging activity (DPPH-RSA), Hunter L, a and b values were significant ($P < 0.001$). It was determined that maximum betalain values were reached at 60°C-40 min and 80°C-25 min of thermal assisted ultrasonic extraction (TAUE) then decreased with increasing time. In the 40°C application of TAUE, betalains increased slowly but remained below the values of other processes (60-80°C). On the other hand, it has been found that the change of betalains is related to TFM, DPPH-RSA and Hunter L, a and b value changes, and the mathematical equations ($R^2 = 84-87\%$) obtained in TDUE conditions can be used to determine the optimum conditions for betalains changes.

Keyword: Red beetroot, *Beta vulgaris* L., betalains, natural colorants, ultrasonic extraction

*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ atillasimsek62@yahoo.com,

☎ (+90) 545 795 3934

☎ (+90) 452 234 6632

GİRİŞ

Renk, tüketici kabulü ve ürünlerin tercihinde önemli rol oynayan bir kalite parametresidir. Tüketicilerin gıdalarda görünüş, beslenme ve güvenlik konusundaki beklenti ve artan ilgisi, gıda endüstrisinde alternatif renklendirici olarak kullanılacak betalainler gibi doğal pigmentlere olan talebi artırmıştır. Bu amaçla günümüzde suda çözünür antosiyaninler ve betalainler ile yağda çözünür karotenoidler ve kurkuminoidler gibi çeşitli pigmentler üretilmekte ve bunların birçoğu gıda boyası olarak muhtelif gıdalarda kullanılmaktadır (Gliszczynska-Świgło vd. 2006; Gengatharan, vd. 2015).

Kırmızı pancarda (*Beta vulgaris* L.) yüksek konsantrasyonda bulunan betalainler, suda çözünebilir ve çekirdek yapısında azot içeren betalamik asit [4-(2-oksoetiliden)-1,2,3,4-tetrahidropiridin-2,6-dikarboksilik asit] 'den oluşur. *Caryophyllales* altında sınıflandırılan 15'ten fazla familyaya ait bitkilerde yapısal olarak ve kesin olarak tanımlanmış yaklaşık 75 betalain (32 betaksantin and 42 betasiyanin) vardır, bunlar kemostatik tanımlamada kullanılırlar. Betalainler, betasiyanin (kırmızı-mor) ve betaksantin (sarı-turuncu) olmak üzere iki alt sınıftan oluşmuştur (Delgado-Vargas vd., 2000; Khan ve Giridhar, 2015). Betalainlerin yıllık üretiminin tahmini 96.8 Gt (Gigaton)'dur. Bu oranın yaklaşık % 99.99'u kırmızı pancardan ve geri kalan kısım amarant tohumu (0.02t), kırmızı pitaya (60.3t) ve kaktüs meyvesinden (18.7t) elde edilmektedir (Khan ve Giridhar, 2015).

Günümüzde betalain pigmentleri ve pigment karışımları hem gıdalar zenginleştirmek, hem de renk değişikliğini engellemek amacıyla, şekerleme, yoğurt, dondurma, salata sosları, hazır kek, et ürünleri, toz içecek, krema, puding, marşmelov, alkolsüz içecekler ve jelatin kaynaklı tatlılarda renklendirici olarak kullanılmaktadır. Çoğu gıdalara 50 mg/kg düzeyinde katılan betanin istenilen rengi sağlamada yeterlidir (Delgado-Vargas vd., 2000; Khan, 2016). Ayrıca pancar suyu konsantresi veya pancar tozu şeklinde gıda yanı sıra ilaç ve kozmetik ürünler için de doğal katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Gıda renk maddesi olarak betalainlerin kullanılmasına

Avrupa birliği E-162 kodu ile onay vermiştir (Gliszczynska-Świgło vd., 2006; Gengatharan, vd., 2015). Diğer taraftan sarı turuncu renk aralığı için karotenoidler doğal renk maddesi olarak gıdalarda kullanılmaktadır, ancak suda çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle yerine betalainlerden betaksantin daha çok tercih edilmektedir (Khan, 2016).

Gıdalara kırmızı-mor renk tonunu vermek amacıyla, antosiyaninler kullanılıyor olsa da antosiyaninlere göre geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil olan betalainlerin kullanımı daha yaygındır. Ekstraksiyonu sırasında, ortamın pH'sı, su aktivitesi, sıcaklık, ışık, oksijen, metaller (demir, bakır, kalay ve alüminyum gibi metal katyonlar) ve enzimatik aktivite betalainlerin konsantrasyonunu etkilemektedir. Betalainlerin renk yoğunluğu pH 3 ile 7 arasında nispeten değişmez, fakat 3'ten düşük pH değerlerinde mor-viyoleye döner. Renk 7'den yüksek pH değerlerinde ise betanin kaybı nedeniyle daha sarımsı-kahverengiye dönüşür. Bununla birlikte, optimal pH'da betalain parçalanmasını etkileyen en belirleyici faktör sıcaklıktır. Diğer taraftan, uygulanan ısıl prosesler, beta-bağları ve dolayısıyla gıda rengini ve antioksidan aktivitesini değiştirmede etkilidir (Roy vd., 2004; Stintzing ve Carle, 2004). Betalainleri stabilize etmek için, kompleks oluşturma (β -siklodekstrin (β -CD), hidrokspipil- β -CD (HP- β -CD) ve sülfobütiler- β -CD (SBE- β -CD) betanin, kompleksleri), kopigmentasyon ve enkapsulasyon teknikleri son yıllarda başarıyla uygulanmaktadır (Khan, 2016).

Yapılan çalışmalar, betalainlerin antimikrobial, antiviral etkiye sahip olduğunu, antioksidan ve radikal süpürücü özelliklerinden dolayı ise bazı oksidatif stresle ilişkili hastalıklara karşı korunmada, kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin (kemoterapik etki) önlenmesinde kullanılabileceğini göstermiştir (Strack vd., 2003; Gliszczynska-Świgło vd., 2006; Ravichandran vd., 2013; Swarna, vd., 2013). Bir diğer çalışmada, betalainlerin kaynağı olan kırmızı pancar, amarant, kaktüs meyvesi ve kırmızı pitahaya (ejder meyvesi) gibi meyvelerin antioksidan, anti-kanser, anti-lipidemik (kolesterolü ve kısa zincirli yağ asitlerin oluşumunu engellediği) ve

antimikrobiyal aktivite gibi farmakolojik özelliklere sahip olduğunu, bu meyvelerin fonksiyonel gıdaların yapısında yer alması gerektiği belirtilmiştir (Ninfali ve Angelino, 2013; Gengatharan vd., 2015).

Kırmızı pancardan betalainlerin ekstraksiyonunda, ısıl prosesler (Delgado-Vargas vd., 2000; Herbach, 2004; Ravichandran vd., 2013), mikrodalga (Ravichandran vd. 2013; Cardoso-Ugarte vd. 2014) ve konsantrasyonunda mikroltrasyon (Amirasgari ve Mirsaeedghazi, 2015) ve ozmotik distilasyon (Amirasgari ve Mirsaeedghazi, 2016) yöntemlerinin kullanıldığı ve söz konusu yöntemlerin betalainler üzerine etkisinin tartışıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmada, kırmızı pancara ultrasonik banyoda farklı sıcaklık ve sürede ısıl işlem (TDUE) uygulayarak betalainler yanında TFM, DPPH-RSA ve Hunter L, a ve b değerindeki değişimin izlenmesi ve betalainlerdeki değişimin matematiksel eşitliklerle ortaya konulması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada hammadde olarak kullanılan kırmızı pancar örnekleri Ordu ili ve çevresinden önceden belirlenmiş bahçelerden hasat olum evresinde örnekleme kurallarına göre sökülmüş, Ordu Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, araştırma laboratuvarlarına getirilen örnekler yaprak, kök kesildikten sonra üzerindeki çamur musluk suyunda yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Dilimleme aparatında 1x1 cm boyutlarında küplere ayrılan kırmızı pancar örnekleri falkon tüplere tartılmış (3.07±0.10 g) ağırlığının 15 katı saf su ilave edilerek 40, 60 ve 80 °C'de 5-210 dk içerisinde ultrasonik banyoda (ISOLAB-3L, ultrasonik güç; 120W, 40 Hz, 5-80°C, 1-60 dk) betalainlerin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Özellikle uzun süreli ekstraksiyonlarda sıcaklığın sabit tutulması için ortama soğuk su ilavesi ve fazla suyun tahliyesi sağlanarak, sıcaklık sapmaları (±2°C) düşürülmüştür. Ekstraksiyon süresi tamamlanan örnekler, buzlu su içerisinde soğutulup, süzildikten sonra analiz süresine kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Betalainler ve toplam betalain miktarı tayini:

Ultrasonik banyoda belirlenen sıcaklık (40, 60 ve 80°C) ve sürelerde (5-210 dk) bekletilmiş ve süzülüş kırmızı pancar örneklerinin sulu (1:15 w/v) ekstraktları santrifüjde 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen pigment (betasiyanin ve betaksantin) özütlerinin miktarları, 1 cm kuvars küvet kullanılarak, iki farklı dalga boyunda (483 ve 535 nm), Lambert Beer'in yasasına göre UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu UV mini-1240, Japonya) absorbans okuması yapılmış ve aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır (Castellanos-Santiago ve Yahia, 2008). Sonuçlar kg ekstrakt başına mg pigment olarak ifade edilmiştir.

$$BC = [(A * DF * MW * Vd * 1000 / e * I * Wd)]$$

BC: Betalain miktarı (mg/kg)

A: 535 nm (betasiyanin) ve 483 nm (betaksantin) dalga boyunda okunan absorbans

DF: Seyreltme faktörü

MW: Betasiyanin (550 g/mol) ve betaksantin (308 g/mol) molekül ağırlığı

Vd: Ekstraksiyon çözeltisinin hacmi (ml)

Wd: Örnek miktarı (g)

e: Molar absorptivite katsayısı, betasiyanin için 60000 L/mol cm, (su içerisinde) betaksantin için 48000 L/mol cm, (su içerisinde)

I: Küvetin çapı (1cm)

Toplam fenolik madde tayini:

Fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu çözeltisi ile verdiği rengin absorbansı spektrofotometrede (UV-VIS Shamadzu UV mini-1240), şahit numuneye karşı 725 nm'de okuma yapılarak saptanmıştır (Singleton ve Rossi, 1965). Örnekler ekstrakte edildikten sonra bulanıklığı gidermek amacıyla 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, ve renk oluşumu karanlık ortamda 90 dk bekletilerek sağlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı (TFM) gallik asit çözeltisi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak gallik asit eşdeğeri (mg GAE/100 g ekstrakt) üzerinden hesaplanmıştır.

DPPH radikal süpürme aktivitesi (% İnhibisyon) tayini:

Örneklerin DPPH radikal süpürme aktivitesi (DPPH-RSA veya % inhibisyon) mor renkli stabil

bir bileşik olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini indirme gücünün ölçülmesine dayanan DPPH yöntemi ile belirlenmiştir (Cemeroğlu, 2010). Analiz için 0.1 ml ekstrakt alınarak 2.9 ml DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. 30 °C'de 30 dk bekletildikten sonra 517 nm dalga boyunda ki absorbans değerleri okunmuştur. DPPH radikalinin inhibisyon oranı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}} \times 100$$

Hunter renk değerleri:

Örneklerin Hunter L, a ve b değerleri renk ölçüm cihazı (Konica Minolta Cr-410) ile ölçülmüştür. Örneklerin renkleri, aletin beyaz plakaya göre L=97.79, a= -0.44 ve b=+2.04 olacak şekilde kalibre edilmesinden sonra okunmuştur (Mc Guire, 1992).

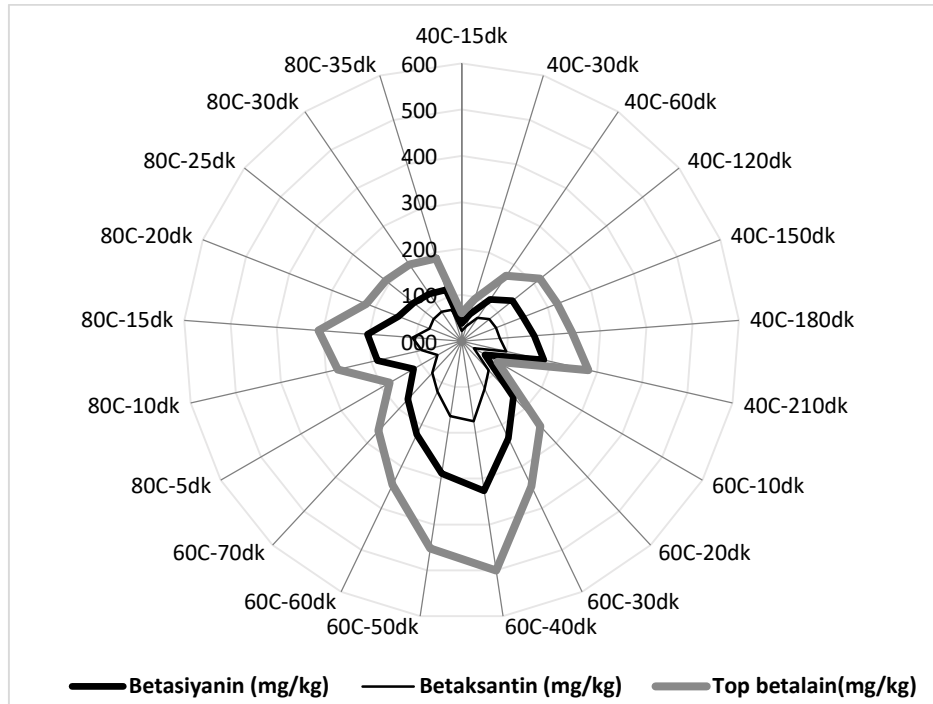
İstatistiksel analiz:

Araştırma Tesadüf Parselleri Faktöriyel Deneme düzende (3 sıcaklık x 7 süre x 2 tekrerrür olmak üzere toplam 42 örnek) kurulup yürütülmüştür.

Verilerin analizinde MİNİTAB 18 istatistik programı kullanılmıştır. Varyans Analizi (ANOVA) sonucunda önemli bulunan varyasyon kaynaklarına ait ortalamalar Tukey Çoklu Karşılaştırma Test'i ile karşılaştırılmıştır (Düzgüneş vd., 1987).

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapılan Varyans Analizi (ANOVA) sonucunda, araştırmada kullanılan kırmızı pancarın betalainleri (betasiyanin, betaksantin), TFM miktarı, DPPH-RSA ve Hunter renk değerleri (L, a ve b) üzerine, TDUE'da kullanılan sıcaklık (T =40, 60 ve 80°C), süre (t =5-210 dk) ve Txt interaksyonlarının etkisi önemli (P <0.001) bulunmuştur. Önemli çıkan ortalamaların Tukey Çoklu Karşılaştırma Test sonuçları Çizelge 1'de ve grafik ile Şekil 1, 2 ve 3' de gösterilmiştir. TDUE'un sıcaklık derecesi (60 ve 80°C) ve bekletme süresine (5-70 dk) bağlı olarak betalainlerin değişimini yansıtan matematiksel eşitlikler ise Çizelge 2'de verilmiştir.



Şekil 1. Betalainler üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (°C, dk) etkisi
Figure 1. Effect of thermal assisted ultrasonic extraction (°C, min.) on betalaines

A. Şimşek

Çizelge 1. Termal destekli ultrasonik ekstraksiyona göre kırmızı pancarın bazı bileşimin öğelerine ait ortalamaların Tukey çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Table 1. Tukey multiple comparison test results of means of some components of red beetroot according to thermal assisted ultrasonic extraction

Proses (Process) (°C, dak) (°C, min)	N	Betalainler (mg/kg) (Betalains)			TFM (mg GAE/100g) (TPC)	DPPH-RSA (%) (DPPH-RSA)	Hunter renk değerleri (Hunter colour values)		
		Betasiyanin (Betacyanin)	Betaksantin (Betaxanthin)	Top.Betalain (Total Betalain)			L	a	b
40-15	2	38.079 ^J	22.360 ^H	60.440 ^I	1.765 ^L	2.34 ^J	57.70 ^A	17.98 ^J	-0.99 ^I
40-30	2	61.049 ^U	33.977 ^{FGH}	95.026 ^{GHI}	5.608 ^{KL}	4.38 ^U	52.93 ^B	22.35 ^I	0.88 ^{HI}
40-60	2	109.592 ^{HI}	61.181 ^{EFGH}	170.772 ^{FGH}	12.513 ^{IJKL}	7.53 ^U	44.48 ^C	33.26 ^{FGH}	5.06 ^{FG}
40-120	2	140.554 ^{EF}	76.155 ^{CDEF}	216.708 ^{DEF}	26.079 ^{GHIJK}	23.46 ^{GHIJ}	39.01 ^{DE}	40.21 ^{ABCD}	9.27 ^{DE}
40-150	2	142.788 ^{EF}	79.409 ^{CDE}	222.198 ^{DEF}	28.223 ^{FGHIJK}	32.79 ^{DEFGH}	37.68 ^{DE}	40.53 ^{ABCD}	9.57 ^{DE}
40-180	2	156.958 ^{DE}	82.774 ^{CDE}	239.732 ^{CDEF}	33.667 ^{FGHI}	32.41 ^{EF}	37.29 ^{DEF}	39.78 ^{ABCD}	9.74 ^{DE}
40-210	2	181.801 ^{CDE}	98.767 ^{CDE}	280.569 ^{CDE}	35.251 ^{EF}	35.94 ^{DE}	36.73 ^{DEF}	39.56 ^{ABCDE}	10.41 ^{CD}
60-10	2	58.507 ^{IJ}	30.740 ^{GH}	89.247 ^{HI}	9.244 ^{JKL}	7.14 ^{IJ}	48.34 ^C	31.03 ^H	2.29 ^{GH}
60-20	2	164.057 ^{CDE}	85.889 ^{CDE}	249.946 ^{CDEF}	29.731 ^{FGHIJ}	26.80 ^{FGHI}	37.05 ^{DEF}	41.49 ^{AB}	10.85 ^{CD}
60-30	2	232.755 ^{BC}	114.631 ^{CD}	347.386 ^{BC}	41.744 ^{EF}	42.05 ^{CDE}	35.98 ^{DE}	41.89 ^A	10.52 ^{CD}
60-40	2	326.347 ^A	174.446 ^A	500.793 ^A	89.474 ^{AB}	69.74 ^{AB}	32.51 ^H	37.10 ^{CDEF}	13.02 ^{BC}
60-50	2	288.830 ^{AB}	163.386 ^{AB}	452.215 ^{AB}	91.190 ^A	68.20 ^{AB}	32.68 ^{GH}	36.66 ^{DE}	12.83 ^{BC}
60-60	2	223.739 ^{BCD}	120.080 ^{BC}	343.819 ^{BC}	66.061 ^{BCD}	60.91 ^{ABC}	33.31 ^{FGH}	36.81 ^{CDEF}	13.36 ^{BC}
60-70	2	170.646 ^{CDE}	93.019 ^{CDE}	263.665 ^{CDEF}	50.710 ^{CDEF}	52.92 ^{AB}	35.65 ^{EF}	36.43 ^{DE}	14.51 ^{AB}
80-5	2	119.393 ^{FGHI}	59.986 ^{EF}	179.379 ^{EF}	23.174 ^{HIJKL}	14.29 ^{HIJ}	39.93 ^D	41.25 ^{AB}	5.80 ^F
80-10	2	186.193 ^{CDE}	87.991 ^{CDE}	274.183 ^{CDEF}	36.224 ^{EF}	33.10 ^{DE}	38.51 ^{DE}	40.91 ^{ABC}	7.26 ^{EF}
80-15	2	203.695 ^{CDE}	106.342 ^{CD}	310.037 ^{CD}	44.022 ^{DE}	47.73 ^{BCDE}	36.65 ^{DE}	40.16 ^{ABCD}	13.36 ^{BC}
80-20	2	146.231 ^{EF}	74.816 ^{DE}	221.048 ^{DEF}	40.767 ^{EF}	55.1075 ^{ABCD}	37.85 ^{DE}	38.65 ^{AB}	14.69 ^{AB}
80-25	2	132.701 ^{FGH}	77.099 ^{CDEF}	209.800 ^{DEF}	48.676 ^{CDE}	59.7926 ^{ABC}	37.76 ^{DE}	37.41 ^{BCDE}	15.69 ^{AB}
80-30	2	123.616 ^{FGHI}	76.749 ^{CDEF}	200.365 ^{EF}	71.115 ^{ABC}	71.6974 ^A	38.23 ^{DE}	35.50 ^{EF}	16.84 ^A
80-35	2	115.969 ^{GHI}	70.655 ^{DE}	186.624 ^{EF}	57.760 ^{CDE}	64.4393 ^{ABC}	39.2225 ^{DE}	32.83 ^{GH}	17.06 ^A

TFM (Toplam fenolik madde), TPC (Total phenolic content)

DPPH-RSA (DPPH-Radikal süpürme aktivitesi), DPPH-RSA (DPPH-Radical scavenging activity)

^{A-L} Aynı harfle işaretlenmiş ortalamalar birbirinden istatistiki açıdan farklıdır.

** Proseslere göre bileşim unsurları ortalamaları arasındaki farkı gösterir ($P < 0.01$)

^{A-L} The averages marked with the same letter are not statistically different from each other.

** Indicates the difference between composition component averages according to process ($P < 0.01$)

Toplam betalainlerin içerisinde betasiyaninlerin betaksantinlere göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu, ekstraksiyon ilerledikçe artan sıcaklık (40, 60 ve 80°C) ve süreye (5-210 dk) göre bu oranın korunduğu Çizelge 1 ve Şekil 1'den izlenebilir. Kırmızı pancarın 40°C-15 dk ekstraksiyonu sonrasında ekstraktlardaki betasiyanin, betaksantin ve toplam betalain değerleri sırasıyla 38.08, 22.36 ve 60.44 mg/kg, 40°C-210 dk

uygulamanın sonunda ise 181.80, 98.77 ve 280.57 mg/kg değerini almıştır. TDUE'un 60 ve 80°C'de farklı sürelerdeki uygulamaları ile mukayese edildiğinde, ulaşılan en yüksek süre olan 210 dk'da dahi betalainlerin ekstraksiyonun tamamlanmadığı ve betalainlerde azalma veya ısıl bozulmanın ise olmadığı tesbit edilmiştir. TDUE'da ekstraksiyon sıcaklığının 20°C artırılarak 60°C'ye çıkarılması halinde ilk 10 dk sonunda

betalainlerden, betasiyaninlerin % 52 (58.50 mg/kg), betaksantinlerin % 36 (30.74 mg/kg) ve toplam betalainlerin % 48 (89.24 mg/kg) oranında artış gösterdiği saptanmıştır. Betasiyanin, betaksantin ve toplam betalainler, 60°C'de artan ekstraksiyon süreleri ile 40 dk sonuna kadar artış gösterip, maksimum değere ulaşırken (326.35, 174.45 ve 500.79 mg/kg), bu süreyi takip eden sürelerde ise betainlerin azalmaya başladığı, 60°C'nin 70 dk uygulaması ile % 48 kayıpla en düşük değeri (263.66 mg/kg) aldığı görülmüştür. TDUE'un 80°C'de ilk bekletme süresi olan 15 dk sonunda sulu ekstraktta toplam betalainlerin en fazla 310 mg/kg'a kadar çıktığı, fakat artan süreler ile belirgin şekilde azaldığı izlenmiştir. Aynı zamanda 80°C'de 15 dk sonunda ulaşılan en yüksek toplam betalain değerinin, 60°C'nin 60 dk uygulamasında ulaşılan değerinden altında kaldığı saptanmıştır (Çizelge 1 ve Şekil 1).

Diğer taraftan, kırmızı pancar ve kaktüs meyvesi betalainlerin en iyi kaynakları arasında gösterilmektedir. Kaktüs meyvelerinden (*S. stellatus*) alınan 32 pulp örneğinde toplam kuru maddede olmak üzere 856.07–9248 µg/g arasında (Pérez-Loredo, vd., 2016), kırmızı pancarda 8600 µg/g, dikenli armutta (*Opuntia* spp.) 170-8150 µg/g, (Castellanos-Santiago ve Yahia, 2008), aynı meyvenin (*Opuntia ficus indica*) sarı renkli meyvelerinde 37.8 µg/g (betaksantin olarak) ve kırmızı renkli meyvelerinde ise 102 µg/g (betalain ve betaksantin toplamı) (Khatabi, vd., 2016) betalain tesbit edilmiştir. Örneklerimizden termal ultrasonik ekstraksiyon yolu ile elde edilen toplam betalain miktarı (500.79 mg/kg ekstrakt) yukardaki bulgular ile karşılaştırıldığında nispi azalış göstermesine rağmen, betalainlerin büyük kısmının elde edilebildiği ortaya çıkmıştır. Kayıpların sıcaklık ve süre yanında kırmızı pancarın bileşimi (su, mineral madde, ortamın pH'sı, VitC, vs), pancarın parçalanması ve bekletilmesi sırasındaki enzimatik faaliyetler, ışık ve oksijen teması ilgili olduğu düşünülmektedir (Roy vd. 2004; Stintzing ve Carle, 2004). Nitekim, konuyla ilgili olarak yapılan bir çalışmada, betalainlerin ekstraksiyonunda renk maddelerinin stabilitesinin sağlanması için ortamın pH'nın 5, Vit C'nin ise % 0.25 oranında bulunmasının önemli olduğu, ayrıca ortamdaki şeker, pektik

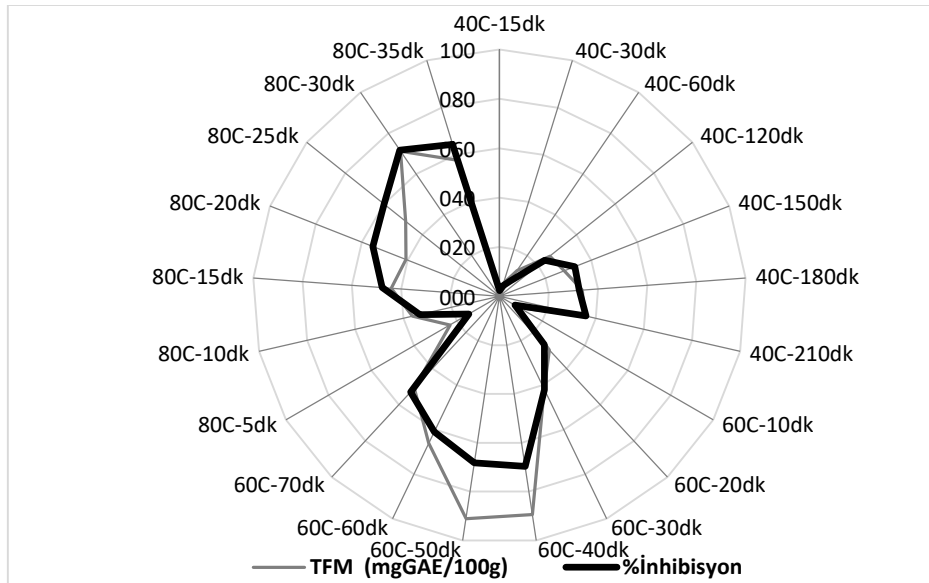
madde ve organik asitlerin çözücüye geçen pigment konsantrasyonunu etkilediği vurgulanmıştır. Bununla birlikte ortamda bulunan flavanların (kateşinler ile schiff bazı oluşturma) betalainleri koruduğu (Khan ve Giridhar, 2015; Khan, 2016) belirtilmektedir ki, yapılan çalışmalar kırmızı pancarın fenolik bileşikler açısından zengin olduğunu göstermektedir (Ninfali ve Angelino, 2013).

Bir diğer önemli sonuç, termal ultrasonik ekstraksiyonda uygulanan 60 ve 80°C'e ait artan sürelerin, betalainleri etkilediği ve betalainlerde kısmi bir azalmaya veya parçalanmaya sebep olduğudur. Farklı araştırmacılar 70°C altındaki sıcaklıklarda betalainlerin parçalanmasında enzimlerin (glikozoksidaz, peroksidaz ve polifenoloksidaz) etkili olabileceğini, inaktivasyonu için 70°C'de 2 dk uygulamanın yeterli olduğunu vurgulamışlardır (Delgado-Vargas vd., 2000; Ravichandran vd., 2013). Bir diğer araştırmacı, betalainlerin korunmasında etkili bir diğer yöntemin ortamdaki serbest suyun bağlanması ((β-siklodekstrin (β-CD), hidroksipropil-β-CD (HP-β-CD) ve sülfobütiler-β-CD (SBE-β-CD)) olduğunu belirtmiştir (Khan, 2016). Bir model sistemindeki betaksantinlerin ışık ve oksijen hariç tutulursa 40°C'de stabil, fakat 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise betasiyaninler gibi sıcaklık derecelerine karşı hassas olduğu vurgulanmıştır (Cai vd., 2001; Roy vd., 2004). İşlenen gıdalara uygulanan mikrodalga, pişirme, kızartma ve vakumda koyulaştırma gibi ısıl işlemlerin, betalainlerin parçalanmasına neden olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Fakat bir kısım araştırmacı, özellikle mikrodalga'nın 900W, 30 s (% 7) ve 1800W, 30 s (% 19) gibi yüksek ışınlamalarının betaksantinlerde artışa neden olduğunu belirtmektedir (Ravichandran vd., 2013). Cardoso-Ugarte vd. (2014) dondurularak kurutulmuş kırmızı pancarda mikrodalga ekstraksiyonu ile optimum miktarda betainlerin eldesinde 400W, 90-120 s'in, maksimum miktarda betaksantinlerinin eldesinde ise 400W, 140-180 s'in yeterli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, çözücü içerisine ilave edilen 0.04 mol/L askorbik asitin iki aşamalı mikrodalga ekstraksiyonunda daha zengin pigment konsantrasyonu

(187.67±26.99 mg/100g) verdiği saptanmıştır. Bir diğer çalışmada vakum altında kurutulmuş kırmızı pancar dilimlerinden elde edilen ekstraktlardaki betasiyanin ve betaksantin miktarının vakum uygulanmadan kurutulmuş örneklerle göre daha yüksek bulunmuş, kontrol örneğine göre betasiyaninlerin % 20 oranında, betaksantinlerin ise % 12 oranında arttığı belirlenmiştir. Betalainlerin korunmasını, ortamdaki oksijenin olumsuz etkisinin ortadan kaldırılmasıyla açıklamışlardır. Isıl işlemlerde kaynama ve kızartma derecelerine ulaşırsa betalainlerde parçalanma olduğu bildirilmektedir ki, konuyla ilgili olarak kırmızı pancar ile yapılan çalışmada, kaynama derecelerinde 60, 120 ve 180 s'lik kısa süreli uygulamaların betasiyaninleri sırasıyla % 6, % 22 ve % 51, betaksantinleri ise % 18, % 23 ve % 33 oranında azalttığı belirlenmiştir (Khan, 2016). Sıcaklığın etkisi ile betalainlerin parçalanması; aldimin bağının bozulması, izomerizasyon, dehidrojenizasyon, dekarboksilasyon, deglikosilasyon reaksiyonları ve ısı-asit ortak etkisi ile ilişkilendirilerek açıklanmıştır (Herbach vd. 2004; Ravichandran vd., 2013; Khan, 2016).

TDUE'da 40°C de 15-210 dk arasında bekletilen ekstraktlardaki TFM miktarı 1.76 mg

GAE/kg'dan 35.25 mg GAE/kg'a ve DPPH-RSA ise % 2.34'den % 35.94'de kadar artış göstermiştir. Toplam betalain değerinin yanı sıra TFM miktarı arttıkça, DPPH-RSA değerinin de artış gösterdiği görülmüştür. TDUE'da, 60°C'de 40-50 dk arasında bekletilen sulu ekstraktlarda, TFM ve DPPH-RSA değeri maksimum değere ulaşmış sırasıyla 89-91.2 mg GAE/100 g ekstrakt ve % 68-69.7 arasında değişmiştir. Söz konusu sıcaklık derecesinde artan süreler, betalainlerde olduğu gibi TFM'nin ve dolayısıyla DPPH-RSA değerinin de azalmasına neden olmuştur. TDUE'da sıcaklık derecesinin 80°C'ye çıkarılması halinde 5 dk süre sonunda TFM'nin, 40°C'nin 15 dk'a göre 13 kat ve 60°C'nin 10 dk'a göre ise 2.5 kat, DPPH-RSA'nın ise aynı sıcaklık derecelerinde sırasıyla 2 ve 3 kat arasında arttığı belirlenmiştir. TFM değişimine benzer değişim ve DPPH-RSA değerinde de görülmüştür. Betalainlerin değişiminden farklı olarak TFM miktarı ve DPPH-RSA değeri 80°C'nin 30 dk'a kadar artış göstermiş, sonra düşmüştür. Diğer taraftan 80°C'de ulaşılan en yüksek TFM ve DPPH-RSA değerleri, 60°C'de ulaşılan maksimum TFM değerinden daha düşük değer vermiş, DPPH-RSA değeri ise benzer sınırlar içerisinde yer almıştır.

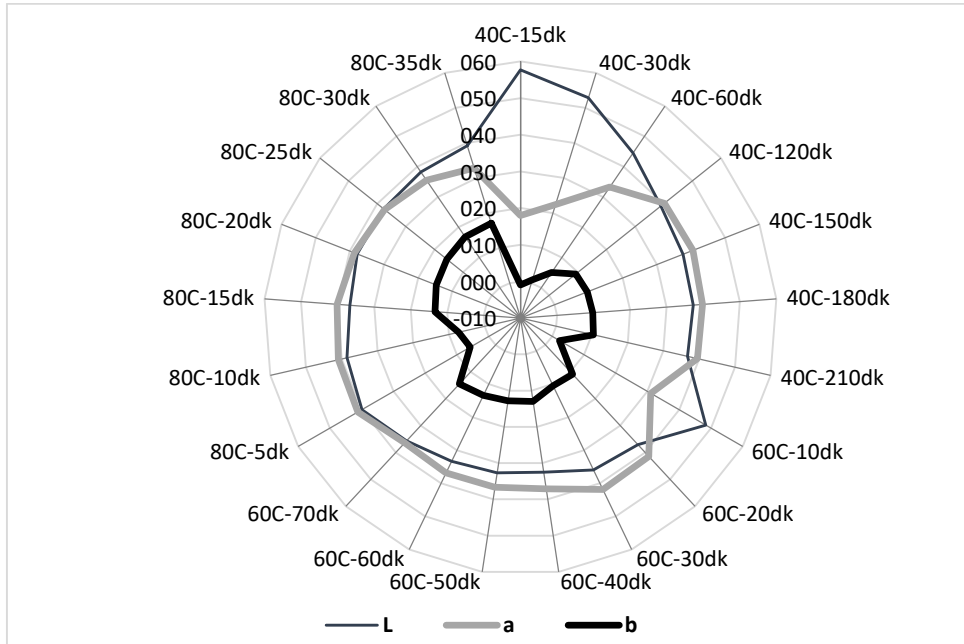


Şekil 2. TFM ve DPPH-RSA (% İnhibisyon) üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (°C, dk) etkisi

Figure 2. Effect of thermal assisted ultrasonic extraction (°C, min.) on TPM and DPPH-RSA (Inhibition %)

Hunter L değerinin üzerine 40°C'de farklı sürelerde uygulanan termal ultrasonik etki ile azaldığı, başlangıçta negatif olan (mor-viyole) Hunter b değeri ortalamasının daha sonra artan TDUE süresi ile artış göstererek pozitif değere yani betanın kaybı nedeniyle rengin daha sarımsı-

kahverengiye dönüştüğü, kırmızılığın göstergesi olan a değerinin ise 40°C-150 dk'lık TDUE uygulamasına kadar arttığı daha sonra hafifçe azaldığı bu azalışın ise istatistiki olarak önemli olmadığı saptanmıştır (Çizelge1, Şekil 3).



Şekil 3. Hunter renk değerleri (L, a ve b) üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun (°C, dk) etkisi

Figure 3. Effect of thermal assisted ultrasonic extraction (°C, min.) on Hunter color values (L, a and b)

Diğer taraftan TDUE'un 60°C-40 dk uygulamasının sonuna kadar Hunter L değeri azalış göstermiş, aynı sıcaklık derecesinin 50, 60 ve 70 dk sonunda ise hafifçe yükselme göstermiştir. Hunter a değeri 60°C-40 dk uygulamasına kadar artış, aynı sıcaklık derecesinin artan sürelerinde ise azalma eğilimi göstermiştir. Hunter b değeri ise 60°C'nin tüm bekletme sürelerinde dalgalanma olmasına karşın artış göstermiş ve 70 dk sonunda 14.51 ortalama değerine ulaşmıştır. TDUE'un uygulandığı bir diğer sıcaklık derecesi 80°C'nin 5-15 dakikalıkları arasında Hunter L değerinin, 39.93 den 36.65'e düştüğü, 15-35. dakikalıkları arasında ise değişimin olmadığı veya ortalamaların istatistiki olarak benzer olduğu ortaya çıkmıştır. Hunter a değeri ise 80°C'nin 5-35 dakikalık bekletme sürelerinde 41.25 den 32.83'e kadar azalış gösterirken, Hunter b değeri ise 5.80 den 17.06'a kadar artış göstermiştir.

Kırmızı pancarın betalainleri, TDUE'un 60 ve 80 °C'de 5-70 dk uygulamaları ile en yüksek değere ulaşmış ve daha sonra artan sıcaklık süresi ile belirgin şekilde azalış gösterdiği için bu sıcaklık derecelerinde değişim gösteren betalainlere ait veriler, çoklu regresyon analizine tabi tutulmuş ve regresyon katsayıları ($R^2 > \% 80$) yüksek olan eşitlikler ortak matematiksel model olarak Çizelge 2' de verilmiştir.

Betasiyanin, betaksantin ve toplam betalain verilerine göre regresyon analizi sonucunda daha yüksek R^2 değerlerine (% 85-87) sahip paraboloid regresyon eşitliği veya üç boyutlu polinom eşitliklerinin hesaplamalarda kullanılması halinde TDUE koşullarında sıcaklık (T) ve süreye (t) bağlı olarak betalainlerin değişiminin daha doğru olarak hesaplanabileceği ortaya çıkmıştır.

Çizelge 2. Kırmızı pancar betalain bileşimi ile TDUE'nin farklı sıcaklık (60-80°C) ve süreleri (5-70 dk) arasındaki matematiksel eşitlikler ($P < 0.01$)Table 2. The mathematical equations between betalain composition of red beetroot and different temperature and time of TAUE ($P < 0.01$)

Parametre (Parameter)		Matematiksel Eşitlikler (Mathematical Equations)	Model R ² (%)
Betasiyanin (Betacyanin)	BS	= -783 + 11.23 T + 52.71 t - 0.2049 t ² - 0.5749 T*t	87.80
	P	(0.000) (0.000) (0.000) (0.000) (0.000)	(0.000)
Betaksantin (Betaxanthin)	BK	= -392.9 + 5.531 T + 26.33 t - 0.1078 t ² - 0.2769 T*t	85.22
	P	(0.000) (0.000) (0.000) (0.000) (0.000)	(0.000)
Toplam betalain (Total betalain)	TB	= -1176 + 16.76 T + 79.04 t - 0.3127 t ² - 0.8518 T*t	87.36
	P	(0.000) (0.000) (0.000) (0.000) (0.000)	(0.000)

T: Sıcaklık (°C), t: Süre (saat)

T: Temperature (°C), t: Time (hour)

Matematiksel modellerde, betalainlerin üzerine sıcaklık (T) ve sürenin (t) linear (primer), sürenin kuadratik (sekonder) etkisi yanında sıcaklık ve sürenin interaksiyon (T*t) etkisinin de önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.001$). Modellerin T ve t'ye ait katsayıları incelendiğinde, betalainlerin değişiminde t'nin linear etkisinin, T'nin linear etkisi, t'nin kuadratik etkisi ile T*t etkisinden daha yüksek olduğu görülmüştür ($P < 0.001$). Ayrıca, tüm regresyon eşitlikleri incelendiğinde T ve t'ye ait katsayıların linear etkisinin betasiyanin, betaksantin ve toplam betalain eşitliklerinde pozitif, t ve T*t'nin katsayılarının ise negatif yönde etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Bir başka ifadeyle, denklemin ilk kısmında T ve t'nin linear etkisinin ekstraktlarda betalainlerin artışına neden olduğu, denklemin ikinci kısmında yer alan t'nin kuadratik ve T*t interaksiyon etkisi ile de betalainlerin azalışına neden olduğu belirlenmiştir.

SONUÇ

Kırmızı pancar ülkemizin de dahil olduğu Akdeniz diyetinde yer alan, salatalarda ve turşu veya fermente suyu olarak yaygın şekilde tüketilen bir sebzedir. Diğer taraftan kırmızı pancardan elde edilen betalainler gıda sanayinde doğal renklendirici olarak muhtelif gıdalarda kullanılmaktadır. Betalainlerin dahil olduğu tüm doğal renk maddelerinin ekstraksiyonu için uygun ekstraksiyon metodlarının yanı sıra optimal koşullarının ortaya konulması günümüzde

tartışılmakta ve araştırılmaktadır. Bu çalışma kapsamında TDUE yönteminin uygunluğu kırmızı pancar betalainleri üzerinde araştırılmış, sonuçta 40°C de uygulanan TDUE ait sürelerin, hem betalainler hem de TFM'nin ekstraksiyon için yeterli olmadığı çok uzun süre gerektirdiği ve uygulamada kullanılmasının anlam taşımadığı ortaya çıkmıştır. TDUE kullanılan sıcaklık dereceleri ve sürelerine karşılık betalainler, TFM, DPPH-RSA, Hunter L, a ve b değerinin değişimi karşılaştırıldığında 60-80°C'de uygulanan sürelerin daha belirgin sonuç verdiği saptanmıştır. Elde edilen matematiksel eşitliklerin betalainlerdeki değişimi yansıttığı ve optimum sıcaklık ve süreleri belirlemede yüksek doğrulukta ($R^2 = \% 84-87$) kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- Amirasgari, N., Mirsaeedghazi, H. (2015). Microfiltration of red beet juice using mixed cellulose ester membrane *J Food Process Preserv*, 39, 614-623.
- Amirasgari, N., Mirsaeedghazi, H. (2016). Non-thermal production of natural betalain colorant concentrate from red beet extract by using the osmotic distillation. *Nutr Food Sci Res*, 3(2): 27-34.
- Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W., Corke, H. (2001). Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigments from *Celosia argentea*, *J Agric Food Chem*, 49, 4429-4435.

- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E.M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry, *J Agric Food Chem*, 56, 5758–5764.
- Cardoso-Ugarte, G.A., Sosa-Morales, M.E., Ballard, T., Liceaga, A., San Martin-Gonzalez, M.F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT- Food Sci Technol*, 59, 276-282.
- Cemeroğlu, B. (2010). Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 34, Ankara, 657 s., ISBN 978-975-98578-6-8.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 40, 173–289.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Gürbüz, F. (1987). Araştırma ve deneme metotları. Ankara Üniv. Yayın No:1021, 381s. Ankara.
- Gengatharan, A., Dykes, G.A., Choo, W.S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods, *LWT - Food Sci Technol*, 64, 645-649.
- Gliszczynska-Świgło, A., Szymusiak, H., Malinowska, P. (2006). Betanin the main pigment of red beet- molecular origin of its exceptionally high free radical scavenging activity, *Food Addit Contam*, 23(11): 1079-1087.
- Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R. (2004). Impact of thermal treatment on color and pigment pattern of red beet (*Beta vulgaris* L.) preparations. *J Food Sci*, 69(6): 491-498.
- Khan, M.I., Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry, *Phytochemistry*, 117, 267-295.
- Khan, M.I. (2016). Stabilization of betalains: A review, *Food Chem*, 197, 1280-1285
- Khatabi, O., Hanine, H., Elothmani, D., Hasib, A. (2016). Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Prickly pear fruits (*Opuntia ficus indica*), *Arab J Chem*, 9(1): 278-281.
- Mc Guire, R.G. (1992). Reporting of objective color measurements. *Hortscience*, 27(12): 1254-1255.
- Ninfali, P., Angelino, D. (2013). Nutritional and functional potential of *Beta vulgaris* and *rubra*. *Fitoterapia*, 89, 188-199.
- Pérez-Loredo, M.G., García-Ochoa, F., Barragán Huerta B.E. (2016). Comparative analysis of betalain content in *stenocereus stellatus* fruits and other cactus fruits using principal component analysis, *Int J Food Prop*, 19, 326-338.
- Ravichandran, K., Thaw Saw, N.M.M., Mohdaly, A.A.A., Gabr, A.M.M., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity, *Food Res Int*, 50, 670-675.
- Roy, K., Gullapalli, S., Roy Chaudhuri, U., Chakraborty, R. (2004). The use of a natural colorant based on betalain in the manufacture of sweet products in India, *Int J Food Sci Technol*, 39, 1087-1091.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phophomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 6:144-158.
- Stintzing, F.C., Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition, *Trends Food Sci Technol*, 15(1): 19-38.
- Strack, D., Vogt, T., Schliemann W. (2003). Recent advances in betalain research, *Phytochemistry*, 62, 247-269.
- Swarna, J., Lokeswari, T.S., Smita, M., Ravindhran, R. (2013). Characterisation and determination of in vitro antioxidant potential of betalains from *Talinum triangulare* (Jacq.) Willd, *Food Chem*, 141(4): 4382-4390.



THE EFFECT OF DIFFERENT MICROWAVE POWERS ON THE DRYING KINETICS AND POWDER PROPERTIES OF FOAM-MAT DRIED EGG WHITE POWDER

Gülşah Çalışkan Koç*, Burcu Çabuk

Alanya Hamdullah Emin Paşa University, Art Faculty, Department of Gastronomy and Culinary Arts, Alanya, Antalya, Turkey

Received / Geliş: 25.12.2018; Accepted / Kabul: 03.03.2019; Published online / Online baskı: 27.03.2019

Çalışkan-Koç, G., Çabuk, B. (2018). The effect of different microwave powers on the drying kinetics and powder properties of foam-mat dried egg white powder. *GIDA* (2019) 44 (2): 328-339 doi: 10.15237/gida.GD18126

Çalışkan-Koç, G., Çabuk, B. (2018). Farklı mikrodalga güçlerinin köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı tozlarının kuruma kinetiği ve toz ürün özellikleri üzerine etkisi. *GIDA* (2019) 44 (2): 328-339 doi: 10.15237/gida.GD18126

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the effect of different microwave powers on the drying kinetics and powder properties of foam mat dried egg white powder. For this purpose, the egg white foam was obtained by using kitchen blender (1000W, 5min) and dried in a domestic microwave oven at five different microwave powers (120-720W). According to the results, the drying time decreased from 360s to 80s according to increasing microwave power ($P < 0.05$). In order to determine the drying kinetic of egg white foam, the experimental data was fitted to various semitheoretical models and one empirical model. Page model which showed the highest R^2 values (0.983-0.994) was chosen as the most suitable model for determining the drying behavior of egg white foam. In addition, the average effective moisture diffusivity and activation energy values were calculated and ranged between $3.3389E-08$ to $1.4139E-07$ m^2/s and 28.0640 W/g , respectively.

Keywords: Egg white, foam mat drying, drying kinetic, thin-layer modeling, powder properties

FARKLI MİKRODALGA GÜÇLERİNİN KÖPÜK KURUTMA YÖNTEMİ İLE KURUTULMUŞ YUMURTA BEYAZI TOZLARININ KURUMA KİNETİĞİ VE TOZ ÜRÜN ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, farklı mikrodalga güçlerinin köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı köpüğünün kuruma kinetiği ve toz özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, yumurta beyazı köpüğü blender kullanılarak (100W, 5dk.) elde edilmiş ve mikrodalga fırında beş farklı mikrodalga gücünde (120-720W) kurutulmuştur. Artan mikrodalga gücü ile kuruma süresi 360s'den 80s'ye azalmıştır ($P < 0.05$). Yumurta beyazı tozunun kuruma kinetiğini belirlemek için, deneysel veriler çeşitli yarı teorik modeller ve bir empirik model kullanılarak modellenmiştir. Yüksek R^2 değeriyle (0.983-0.994) Page model yumurta beyazı köpüğünün kuruma davranışının belirlenmesi için en uygun model olarak seçilmiştir. Ayrıca, ortalama etkin nem difüzyon katsayısı ve ortalama aktivasyon enerjisi hesaplanmış ve sırasıyla $3.3389E-08$ - $1.4139E-07$ m^2/s ve 28.0640 W/g olarak bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Yumurta beyazı, köpük kurutma, kuruma kinetiği, ince tabaka modelleme, toz özellikler

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ gulsahcaliskan86@gmail.com

☎ (+90) 242 513 6969

☎ (+90) 242 513 6966

INTRODUCTION

Foam mat drying is a process in which liquids or semi-liquid/solid foods are transformed into stable foam by using foaming agent and stabilizer and to subsequently be dried (oven, tray dryer, microwave dryer, freeze dryer etc.) under thin-layer conditions (Abbasi and Azizpour, 2016; Venkatachalam et al., 2014; Rajkumar et al., 2007). The drying rate of foam mat drying is comparatively high compared to other drying techniques due to an enormous increase in the liquid-gas interface, in spite of the fact that the heat transfer is impeded by a large volume of gas present in the foamed mass (Sharada, 2013). A high-quality food powder can be obtained by the proper selection of the foaming method, agent, stabilizers, and time and also selected drying method and temperature (Venkatachalam et al., 2014). The advantages of foam mat drying process compared to the other drying techniques are suitability for all types of liquids, rapid drying at a lower drying temperature, high retention of nutritional value, easy reconstitution, and being cost-effective (Kudra and Ratti, 2006).

Egg white (albumen) powder which is rich in protein commonly used as a food ingredient especially in the bakery industry for its foaming and gelling properties (Muthukumaran et al. 2008a). Egg white contains 56% of whole egg's total proteins (Ovalbumin, Ovotransferrin, Ovomuroid, Ovomucin, Lysozyme, G2 and G3 globulin, avidin) along with the majority of the minerals such as chlorine, magnesium, potassium, sodium, and sulfur (Solval, 2011). Egg white powder was used as a foaming agent and stabilizer at several studies such as foam mat freeze-drying of apple juice (Raharitsifa and Ratti 2010), foam mat convective drying of cantaloupe (Salahi et al., 2015) etc.. In addition, the egg white powder can be used as an encapsulating agent in the food industry (Solval, 2011).

There are several studies on the drying of egg white by using different drying techniques such as spray drying (Ayadi et al. 2008; Ma et al., 2013), pulse-spouted bed microwave freeze drying (Wang et al., 2013), and foam mat freeze drying (Muthukumaran et al., 2008a and b). However,

from the authors' knowledge, there is a paucity of literature investigating the effect of foam mat microwave oven drying technique on the drying behavior, drying rate, effective moisture diffusivity, and powder properties of foam mat dried egg white powder. Foam mat microwave drying method is one of the promising methods which combines the advantages of microwave and foam mat drying such as short drying time, higher drying rate, effective moisture diffusivity, surface area, and higher quality of the end product etc. (Alibas, 2006; Kudra and Ratti, 2006; Mathukumaran et al., 2008b). For this reason, the aim of this study was to determine the effect of different microwave powers on the drying kinetics and powder properties of the foam mat dried egg white powder.

MATERIAL AND METHODS

Material

The commercial pasteurized liquid egg whites ($15.0 \pm 0.0^\circ\text{Brix}$, 9.3 ± 0.2 pH, foam capacity 1066.0 ± 0.0 , *Salmonella* absent in 25 g, *Staph. Aureus*. <100 CFU/ml, Enterobacteriaceae <10 CFU/ml) were obtained from Anako Yumurta ve Ürünleri Gıda San. İhr. İth. ve Tic. A.Ş., Ankara, Turkey. Egg whites were kept under refrigeration (4°C) conditions until the next step of the experiment.

Foam Preparation

In order to obtain egg white foam, the method described by Mathukumaran et al. (2008a and 2008b) was used. Before the foaming process, the egg white was removed from the refrigerator and kept outside until reaching room temperature ($+24 \pm 2^\circ\text{C}$). Fifty milliliters of egg white was added to the glass beaker (500ml) to make the egg white foam. A kitchen blender (1000W power, SHB 3107, Sinbo, Turkey) was used to make foam and three different whipping periods as 1.5, 3, and 5min were used. According to visual inspection, the most stable foam was chosen as the foam which was whipped for 5 min.

Microwave Drying

The egg white foams were dried in a domestic microwave oven (Arçelik MD574, Turkey) at 5 different microwave power (120W, 350W, 460W,

600W, and 720W). The egg white foam of approximately 6.00 ± 0.20 g was placed in a glass dish (10.8cm diameter, 2mm side thickness) which was put on the rotating glass of microwave. The thickness of egg white foam was measured by using the caliper. Samples were removed periodically (at 10s intervals) from the microwave oven and weighed. The experiments were completed when the change in the mass of the samples dropped to 0.01 (g) between the two measurements. The drying processes were repeated two times under the same conditions and the average value of the results was taken into consideration for calculations. The egg white foam powder was obtained by grinding the dried material (flakes) with a mortar and packaged in aluminum polythene bags for further analysis.

Mathematical modeling of drying curves and calculations of drying rate

The dried mass of the egg white was determined after drying in the vacuum oven (Nuve Laboratory and Sterilization Tech, EV018, Turkey) at $70 \pm 5^\circ\text{C}$ in order to calculate the moisture content (AOAC, 2000). The moisture ratio (MR) of egg white foam during microwave oven drying was calculated using the Eq. (1);

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e} \quad (1)$$

Where M_t , M_0 , and M_e are the moisture content at any time, initial, and equilibrium moisture contents (kg water (H_2O)/ kg dry matter (DM)), respectively.

Drying curves were fitted to seven well-known semi theoretical thin layer drying models (Lewis ($MR = \exp(-kt)$), Page ($MR = \exp(-kt^n)$), Henderson and Pabis ($MR = a \cdot \exp(-kt)$), Logarithmic ($MR = a \cdot \exp(-kt) + c$), Two-Term ($MR = a \cdot \exp(-k_0t) + b \cdot \exp(-k_1t)$), Two-Term Exponential ($MR = a \cdot \exp(-kt) + (1-a) \cdot \exp(-kat)$), and Approximate Diffusion models ($MR = a \cdot \exp(-kt) + (1-a) \cdot \exp(-kbt)$) and one empirical model (Wang and Singh ($MR = 1 + at + bt^2$)) (Onwude et al., 2016). Nonlinear regression analysis was used to evaluate the parameters of the selected model by using statistical software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A). The goodness of fit was determined using the coefficient of correlation

(R^2) that can be described by the equations given by Erbay and Icier (2009).

The assumptions for thin-layer drying models which were also reported by Erbay and Icier (2009) are;

- Moisture was initially uniformly distributed throughout the mass of the product.

- The surface moisture content of the sample instantaneously reached equilibrium with the condition of the surroundings.

- Resistance to mass transfer at the liquid-gas interface was negligible.

- The product characteristics (diffusion coefficient etc.) were constant and the shrinkage was negligible.

Drying rate was defined as:

$$\text{Drying Rate (DR)} = \frac{\Delta X}{\Delta t \cdot S} \quad (2)$$

where X is moisture content (kg H_2O /kg DM), t is the time (s), S is the total surface area of all egg white foam in one container (m^2) and DR is the drying rate (kg H_2O /kg DM.s. m^2) (Tekin and Baslar, 2018).

Calculation of Effective Moisture Diffusivity and Activation Energy

The effective moisture diffusivity (D_{eff}) values of egg white foams were calculated by Fick's diffusion model as given in (Eq. 3).

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} \exp \left[- (2n-1)^2 \pi^2 \frac{D_{\text{eff}}}{4L^2} t \right] \quad (3)$$

Where t is the time (s), D_{eff} is the effective moisture diffusivity (m^2/s) and L (m) is the thickness of samples. For sufficiently long drying times ($n=1$) (Crank, 1975), the change in MR value becomes linear, a limiting case of Eq. (3) is obtained, that allows the calculation of D_{eff} value from the slope of the natural logarithm of MR versus drying time curve by using the only first terms ($n = 1$) of Eq. (4)

$$\ln MR = \ln \left(\frac{8}{\pi^2} \right) - \left(\frac{\pi^2 D_{\text{eff}}}{4L^2} \right) t \quad (4)$$

D_{eff} is typically calculated by plotting experimental MR in logarithmic form versus drying time. From

the Eq. (3), a plot of $\ln MR$ versus drying time gives a straight line with a slope of (Eq. 5):

$$\text{Slope} = \frac{\pi^2 D_{\text{eff}}}{4L^2} \quad (5)$$

The relation between D_{eff} and microwave power is assumed to be an Arrhenius function (Eq. 6) (Dadali et al., 2007).

$$D_{\text{eff}} = D_0 \exp\left(-E_a \frac{m}{P}\right) \quad (6)$$

where D_{eff} is the effective moisture diffusivity (m^2/s), D_0 is the pre-exponential factor (m^2/s), E_a is the activation energy (W/g), P is the microwave power (W) and m is the mass of the sample (g).

Powder Properties

For the determination of bulk density, the modified procedure described by Jinapong et al. (2008) was used. For this purpose, one gram (m) of egg white powder was loaded into a 10 ml graduated cylinder. The directly measured volume (V_1) was used to calculate the bulk density (Q_{bulk}) according to the ratio of mass to volume. The tapped density (Q_{tapped}) was calculated after tapping the cylinder on a soft surface for 80 times (V_2). Flowability and cohesiveness values of the powders were calculated by using the relationship between the bulk and tapped densities and evaluated in terms of Carr index (CI) and Hausner ratio (HR), respectively (Jinapong et al., 2008). The wettability times of powders were determined by measuring the time for completely wetting 1 g of sample placed around a beaker of 100 ml containing 10 ml of distilled water at room temperature (Goula and Adamopoulos, 2008).

Statistical Analysis

The data was analyzed using statistical software SPSS 16.0 (analysis of variance (ANOVA), ($\alpha = 0.05$), SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.). All drying experiments were replicated and all analyses were triplicated.

RESULTS AND DISCUSSION

The drying behavior of egg white foam was determined from the mass loss in the samples of the known initial moisture content of $87.8 \pm 0.05\%$ (wet basis, wb). The result was consistent with the result of Mathukumaran et al. (2008b, 88% wb). The drying time of the egg white foam

ranged between 80s and 360s and an increase in the microwave power resulted in a significant decrease in the drying time except for 600W microwave power ($P < 0.05$). This situation may be due to higher water evaporation rate at the high microwave power which causes higher generation in the sample (higher vapor pressure differences between the center and surface of the product) (Moradi et al., 2013). The drying time of foam mat freeze-drying (25g sample, -40°C condenser temperature, $+20^\circ\text{C}$ heating plate temperature) of egg white foam was found to be as 20-24h by Mathukumaran et al. (2008b). By using microwave drying technique, the drying time of egg white foam could be significantly decreased compared to the freeze-drying technique. In addition to the selected drying methods, equipment, drying conditions, amount, thickness, moisture content, and foam structure and stability of egg white foam may cause different drying times.

The drying behavior of egg white foam was described by using seven well-known semitheoretical thin layer drying models and one empirical model. The model parameters and correlation coefficients (R^2) are given in Table 1. The highest coefficient of correlation was one of the primary criteria for selecting the best model to define the drying behavior of egg white foam (Erbay and Icier, 2009). Drying behavior of egg white foam can be adequately described by the selected models due to higher R^2 values of models which were found to be higher than 0.800. However, Page model which showed the highest R^2 value was chosen as the most suitable model for determining the drying behavior of egg white foam. In addition, Arabhosseini et al. (2009) reported that fewer numbers of the model parameters are preferable to find a relationship between the parameter and the drying conditions which are valid for Page model. Several researchers reported that Page model was chosen to determine the microwave drying behavior of corn husk (Akdoğan et al., 2017), onion (Demiray et al., 2017), spinach (Ozkan et al., 2007), and apple pomace (Wang et al., 2007). The calculated drying rate constant (k) of Page equation ($1/\text{s}$) significantly increased according to the increasing microwave power from 120W to 350W ($P < 0.05$),

however, further increase did not cause a significant change in the k values ($P > 0.05$). According to the drying rate constant, it can be said that the higher moisture removal rate and

drying rate occurred during drying experiments which performed in the 350-720W microwave powers.

Table 1. The model parameters, and statistical results (R^2) (n=3)

MODELS	MODEL PARAMETERS							R^2	
	a	b	c	k (s ⁻¹)	k ₀	k ₁	n		
120	Newton	-	-	-	0.050±0.000	-	-	-	0.848±0.040
	Page	-	-	-	1.629E-005±0.00	-	-	2.710±0.002	0.994±0.005
	Henderson and Pabis	1.166±0.022	-	-	0.006±0.000	-	-	-	0.880±0.044
	Logarithmic	5.808±1.584	-	-4.761±1.566	0.001±0.000	-	-	-	0.950±0.051
	Two-Term	0.584±0.011	0.582±0.011	-	-	0.006±0.000	0.006±0.000	-	0.880±0.044
	Two-Term Exponential	0.000±0.000	-	-	20.369±1.359	-	-	-	0.848±0.036
	Approximation of Diffusion	-92.449±12.75	0.987±0.001	-	0.012±0.00	-	-	-	0.932±0.054
	Wang and Singh	-0.003±0.000	5.26E-007±0.000	-	-	-	-	-	0.975±0.014
	350	Newton	-	-	-	0.018±0.001	-	-	-
Page		-	-	-	0.001	-	-	1.705±0.003	0.990±0.006
Henderson and Pabis		1.127±0.016	-	-	0.020±	-	-	-	0.904±0.001
Logarithmic		2.320±0.435	-	1.271±0.425	0.006±0.002	-	-	-	0.969±0.005
Two-Term		0.563±0.080	0.565±0.084	-	-	0.020±0.001	0.020±0.001	-	0.904±0.002
Two-Term Exponential		0.000±0.000	-	-	59.037±4.790	-	-	-	0.885±0.006
Approximation of Diffusion		-	0.990±0.000	-	0.042±0.001	-	-	-	0.965±0.004
Wang and Singh		116.597±5.484	2.226E-005±0.179E-005	-	-	-	-	-	0.967±0.003
460		Newton	-	-	-	0.022±0.001	-	-	-
	Page	-	-	-	0.001	-	-	1.904±0.003	0.983±0.011
	Henderson and Pabis	1.134±0.009	-	-	0.025±0.002	-	-	-	0.895±0.117
	Logarithmic	2.752±0.723	-	1.696±0.723	0.007±0.002	-	-	-	0.978±0.011
	Two-Term	0.557±0.007	0.577±0.006	-	-	0.025±0.002	0.025±0.002	-	0.895±0.012
	Two-Term Exponential	0.000±0.000	-	-	87.906±3.256	-	-	-	0.872±0.015
	Approximation of Diffusion	-	0.989±0.01	-	0.054±0.002	-	-	-	0.966±0.003
	Wang and Singh	120.911±15.597	2.478E-005±0.608E-005	-	-	-	-	-	0.968±0.002
	600	Newton	-	-	-	0.029±0.002	-	-	-
Page		-	-	-	0.001	-	-	2.076±0.005	0.993±0.007
Henderson and Pabis		1.117±0.009	-	-	0.032±0.002	-	-	-	0.911±0.005
Logarithmic		2.175±0.285	-	1.119±0.290	0.010±0.002	-	-	-	0.973±0.004
Two-Term		0.559±0.005	0.559±0.005	-	-	0.032±0.002	0.032±0.002	-	0.914±0.001
Two-Term Exponential		0.000±0.000	-	-	101.527±4.974	-	-	-	0.894±0.007
Approximation of Diffusion		-	0.990±0.001	-	0.068±0.003	-	-	-	0.977±0.002
Wang and Singh		127.542±9.155	5.551E-005±1.348E-005	-	-	-	-	-	0.971±0.004
720		Newton	-	-	-	0.050±0.000	-	-	-
	Page	-	-	-	0.001	-	-	2.000±0.001	0.990±0.01
	Henderson and Pabis	1.126±0.001	-	-	0.033±0.001	-	-	-	0.912±0.002
	Logarithmic	1.662±0.044	-	0.599±0.039	0.015±0.001	-	-	-	0.963±0.001
	Two-Term	0.555±0.013	0.571±0.014	-	-	0.033±0.001	0.033±0.001	-	0.912±0.001
	Two-Term Exponential	0.000±0.000	-	-	100.540±4.487	-	-	-	0.893±0.002
	Approximation of Diffusion	-	0.989±0.000	-	0.073±0.001	-	-	-	0.979±0.001
	Wang and Singh	123.099±3.284	8.999E-005±0.490E-005	-	-	-	-	-	0.962±0.000

The change in the experimental (MR_{exp}) and predicted (MR_{pre} , Page Model) moisture ratio values of egg white foam versus drying time results are shown in Figure 1. The curves of egg white foam showed an exponential tendency and it was also observed that the drying kinetic of egg foam at 120W microwave power had a different trend compared to other microwave powers. The drying kinetics of egg white foam at 350-720W microwave powers showed a similar trend. As expected, the moisture removal rate was high

during the initial stage of drying and then slowed down due to a reduced moisture content of the egg white foam. Mathukumaran et al. (2008b) reported that the moisture removal rate of egg white foam during foam mat freeze-drying was higher during the initial stage of drying due to the higher surface area of egg white foam which helped in faster removal of moisture from the sample. In addition, the higher moisture content of the egg white foam may be the reason of higher moisture rate at the initial stages of the drying.

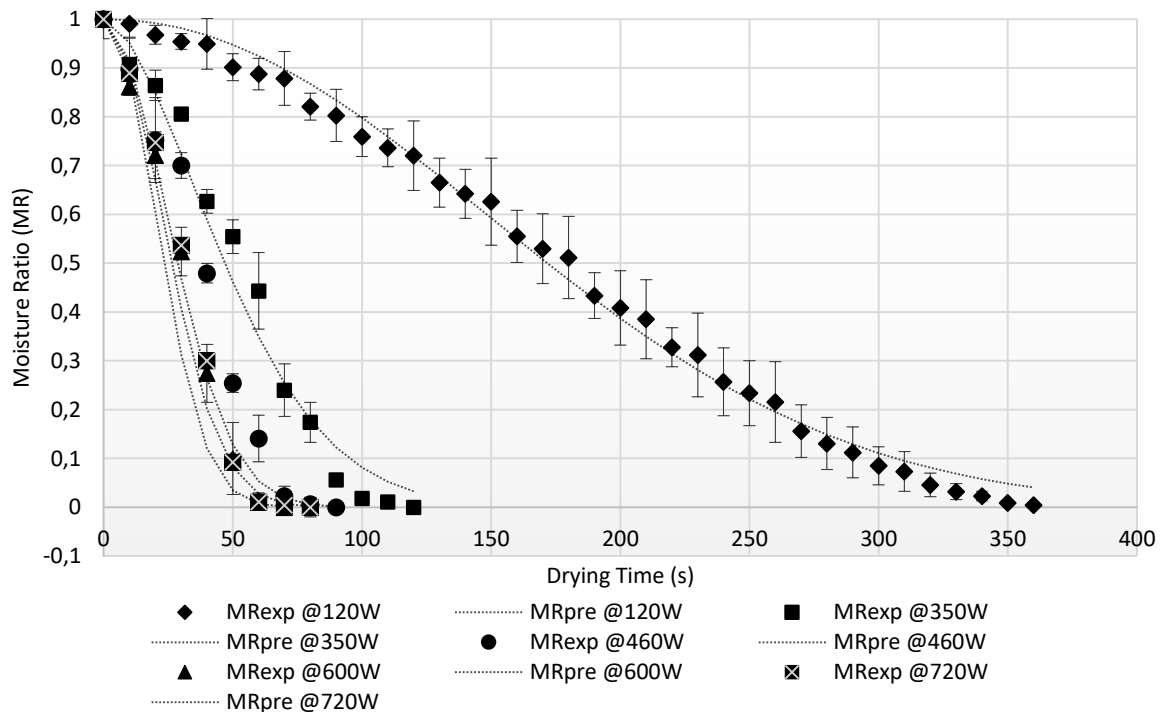


Figure 1. The experimental and predicted moisture ratio values of egg white foam during microwave drying.

The drying rates of egg white foam were calculated ($\text{kg H}_2\text{O} / \text{kg DM} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^2$) and plotted against the free moisture content (X_f , $\text{kg H}_2\text{O} / \text{kg DM}$) as shown in Figure 2. The drying rate accelerated with an increase in the microwave power and the highest values of drying rate were obtained during the drying experiment at 720W microwave power. Marzec et al. (2010) reported that higher microwave powers resulted in a higher evaporation rate which is related to the drying rate. In the microwave drying, the water molecules directly absorb and transmit the energy which resulted in homogeneous heat generation and fast boiling of water (Baysal et al., 2003). As a

result, at the higher microwave power, the higher drying rate of egg white foam was observed due to higher heat generation and faster evaporating rate of water. As the drying progressed, the lower moisture content of egg white foam resulted in a decrease in the absorption of microwave power and drying rate. Similar results were also obtained by Moradi et al. (2013). According to Figure 2, it can be stated that although the initial moisture contents of the egg white foam were high, the overall drying process takes place in the falling rate periods for all drying experiments except for 120W microwave drying experiments.

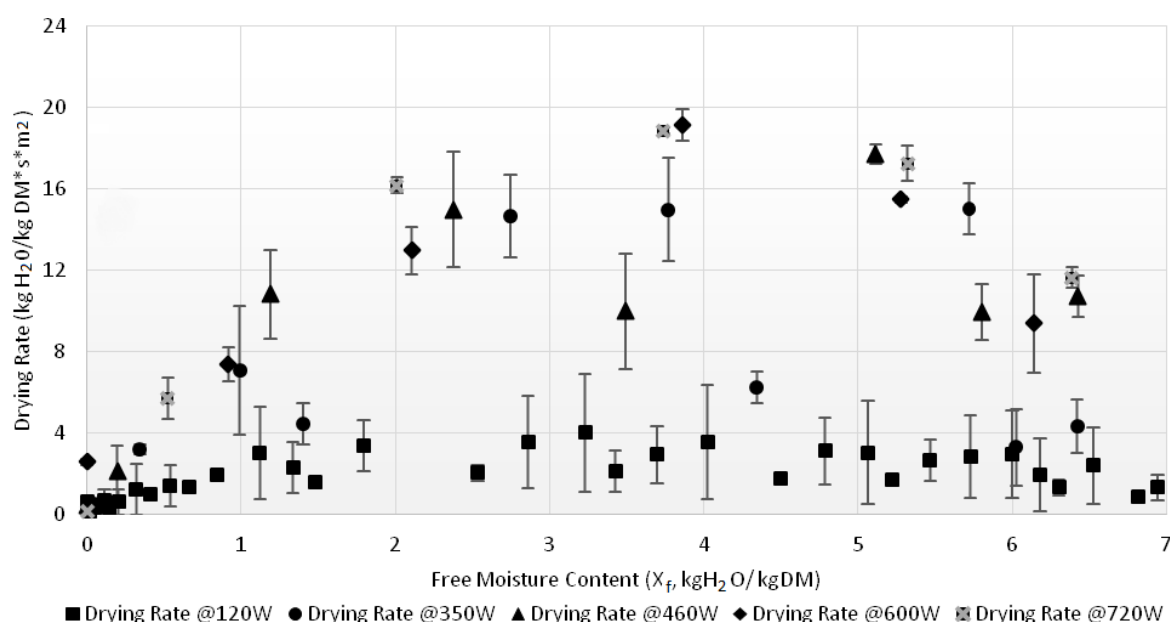
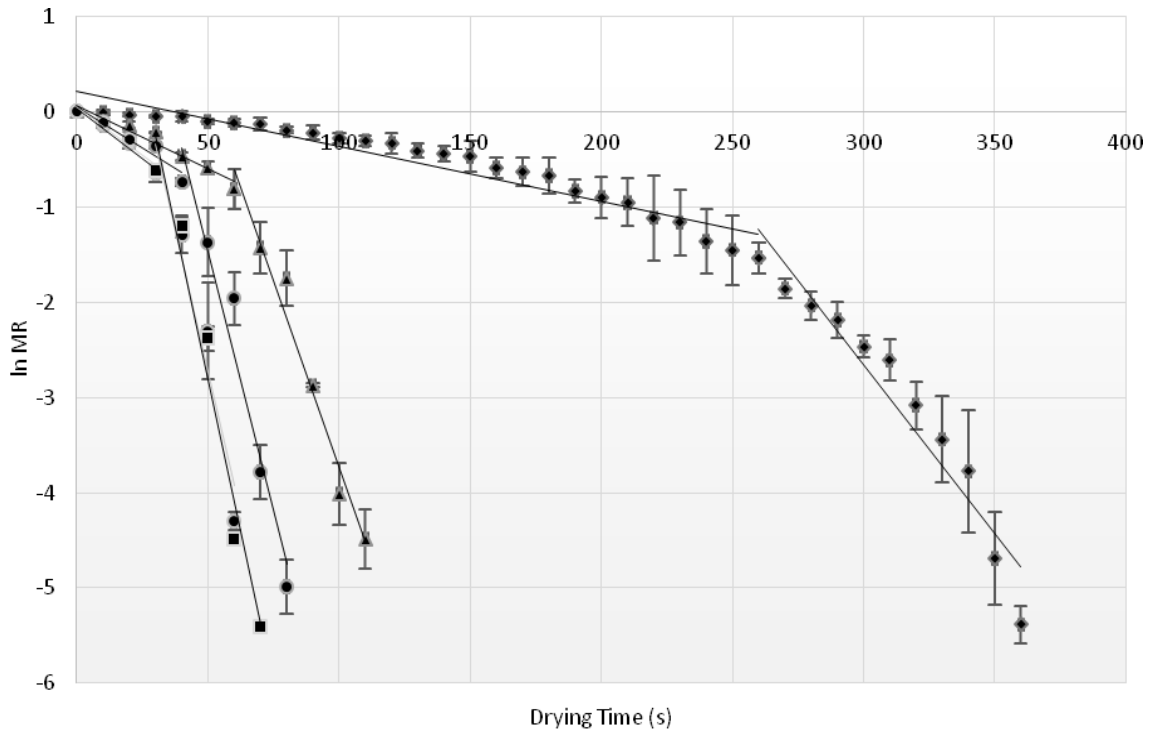


Figure 2. The drying rate ($\text{kg H}_2\text{O}/\text{kg DM}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^2$) of egg white foam

The effective moisture diffusivity values were calculated by plotting the natural logarithm of moisture rate data versus drying time for egg white foam (Figure 3). According to Figure 3, it can be stated that two different kinetics were observed for egg white foam. For this reason, two different D_{eff} values were calculated for all drying experiments and results are given in Table 2. It may be due to the changes in the structure of the egg foam. At the initial stages of the drying experiments, the foam volume and surface area increased due to the porous structure of foam, however, then the volume and surface area of foam decreased. In order to calculate D_{eff} values, it was assumed that the moisture diffusion coefficient is the same in all directions (isotropic material) and shrinkage of the sample is negligible. Similar results were also obtained by Mathukumaran et al. (2008b). Mathukumaran et al. (2008b) reported that the increase in the effective moisture diffusivity values as the drying progress can be attributed to the foaming of egg white. In addition, as drying continues, the development of porous structure reduces the resistance to mass transfer. According to Table 2, it can be stated that the development of porous structure resulted in higher effective moisture diffusivity values (the 2nd D_{eff} values were found

to be higher than 1st one). Mathukumaran et al. (2008b) also reported that the egg white foam with 0.125% xanthan gum had three diffusion coefficients ($2.677 \text{ E-}08$, $5.962\text{E-}08$, and $1.247 \text{ E-}07 \text{ m}^2/\text{s}$ (Average= $7.036\text{E-}08 \text{ m}^2/\text{s}$)) where the egg white foam without xanthan gum had only two diffusion coefficients ($2.413\text{E-}08$ and $3.781 \text{ E-}08 \text{ m}^2/\text{s}$ (Average= $3.097\text{E-}08 \text{ m}^2/\text{s}$)). The D_{eff} values of egg white foam were found to be in the same range of the results of Mathukumaran et al. (2008b). In addition, the average D_{eff} values of egg white foam increased with increasing microwave power due to higher moisture removal and drying rate. Demiray et al. (2017) reported that the D_{eff} value and drying rate have a directly proportional relationship. Similar to drying rate values, the higher D_{eff} values were observed for 900W microwave power. In addition, Sadeghi et al. (2013) reported that microwave energy causes rotating bipolar molecules with high frequency into the product. The generated heat inside the product due to the existence of the friction against the bipolar rotation causes moisture to be diffused outside. Because of the high moisture content of the product, employing microwave power during drying considerably improves moisture diffusion.



◆ ln MR_{exp} @120W ▲ ln MR_{exp} @350W ● ln MR_{exp} @460W ● ln MR_{exp} @600W ■ ln MR_{exp} @720W
 Figure 3. Plots of the natural logarithm of MR (lnMR) against drying time (s) for different microwave powers

Table 2. The effective moisture diffusivity (D_{eff}) (n=3)

Microwave Power (W)	MR	Equation	R ²	Effective Moisture Diffusivity (m ² /s)	Average Effective Moisture Diffusivity (m ² /s)
120	MR ≥ 0.157 ± 0.08 ^a	y = -0.0065x + 0.2330	0.8341 ± 0.1281	1.0467E-08 ± 1.4917E-09 ^a	3.3389E-08
	MR ≤ 0.157 ± 0.08 ^a	y = -0.0347x + 7.2690	0.9557 ± 0.0377	5.6311E-08 ± 1.6065E-09 ^c	
350	MR ≥ 0.386 ± 0.08 ^c	y = -0.0150x + 0.0740	0.9166 ± 0.0415	2.4342E-08 ± 3.4424E-09 ^a	8.5602E-08
	MR ≤ 0.386 ± 0.08 ^c	y = -0.0905x + 4.7963	0.9580 ± 0.0036	1.4686E-07 ± 9.6388E-09 ^d	
460	MR ≥ 0.494 ± 0.02 ^d	y = -0.0164x + 0.0574	0.8903 ± 0.0486	2.6614E-08 ± 1.8360E-09 ^a	9.5501E-08
	MR ≤ 0.494 ± 0.02 ^d	y = -0.1013x + 3.7585	0.9404 ± 0.0191	1.6439E-07 ± 1.8130E-08 ^d	
600	MR ≥ 0.559 ± 0.05 ^e	y = -0.0190x + 0.0347	0.9556 ± 0.0146	3.0833E-08 ± 5.0489E-09 ^{ab}	1.1842E-07
	MR ≤ 0.559 ± 0.05 ^e	y = -0.1270x + 3.7266	0.9096 ± 0.0405	2.0601E-07 ± 1.6868E-08 ^c	
720	MR ≥ 0.289 ± 0.02 ^b	y = -0.0301x + 0.1428	0.9044 ± 0.0022	4.8765E-08 ± 2.1802E-09 ^b	1.4139E-07
	MR ≤ 0.289 ± 0.02 ^b	y = -0.1442x + 4.5563	0.9854 ± 0.0102	2.3401E-07 ± 6.4259E-09 ^f	

^{a-f} show the significant differences between the samples ($P < 0.05$)

The activation energy (E_a) is related to the required energy to facilitate moisture diffusion. Lower E_a values indicate that the lower energy is necessary for moisture diffusion (Tekin and Başlar, 2018). Plots of the natural logarithm of D_{eff} values ($\ln D_{eff}$) against m/P for different microwave powers are shown in Figure 4. The pre-exponential factor and activation energy values were calculated to be as (by using first D_{eff} values) $4.5983E-08m^2/s$ and $30.496W/g$, (by

using second D_{eff} values), $2.7459E-07m^2/s$ and $32.187W/g$, and (by using average D_{eff}) to be as $1.3635E-07m^2/s$ and $28.064W/g$, respectively. According to results, it can be stated that the D_{0-1} and E_{a-1} values which were calculated by using 1st D_{eff} values were found to be lower than the D_{0-2} and E_{a-2} values which were calculated by using 2nd D_{eff} values. In addition, the E_a value which was calculated by using average D_{eff} values was found to be lower than both E_{a-1} and E_{a-2} values.

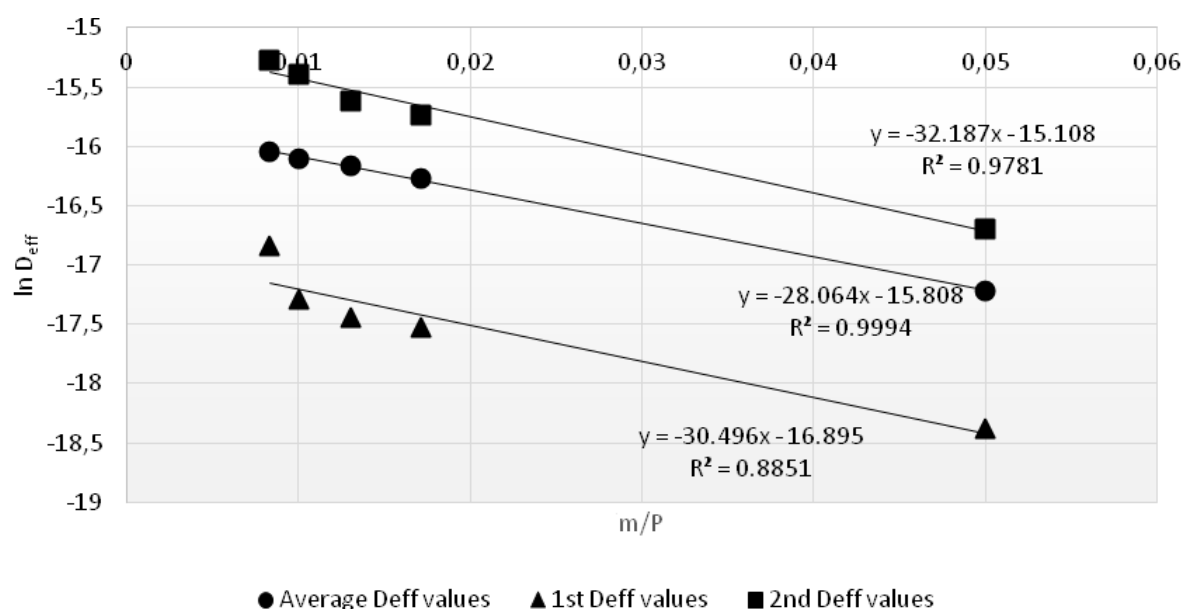


Figure 4. Plots of the natural logarithm of D_{eff} values ($\ln D_{eff}$) against m/P for different microwave powers

Powder properties of egg white powder

The powder properties of egg white powder are given in Table 3. The bulk and tapped density values of egg white powder ranged between 282.33 and $331.35kg/m^3$ and 416.68 and $514.58 kg/m^3$, respectively. The bulk density values of egg white powder insignificantly decreased when the microwave power increased from $120W$ to $350W$ ($P >0.05$), however, the further increase ($350W$ to $460W$) resulted in a significant decrease ($P <0.05$). Beyond $460W$ microwave power, the bulk density values of egg white powders increased, however, this increase was not found to be significant ($P >0.05$). Similarly, the tapped density values of the samples decreased up to $460W$ microwave power ($P <0.05$). Lower Carr

index reflects better flowability whereas high Hausner ratio shows that the powder is more cohesive and less capable of flowing freely. The egg white powder showed fair flow characteristic and high cohesiveness. In order to improve the flow properties of egg white powder, several food-grade additives such as drying agent and foam stabilizer which improve the flow properties can be added or agglomeration process can be applied to the obtained powders. Opposite to the bulk and tapped density values, the wettability times of the powders firstly increased ($120W$ to $460W$, $P <0.05$), however further increase resulted in a decrease in the wettability times of powders ($460W$ to $600W$, $P <0.05$).

Table 3. The effect of different microwave powers on the powder properties of the egg white powder (n=3)

Microwave Power (W)	Bulk Density (kg/m ³)	Tapped Density (kg/m ³)	Flowability (Carr Index, CI)	Cohesiveness (Hausner Ratio, HR)	Wettability (s)
120	313.11±16.02 ^{bc}	495.22±29.82 ^{cd}	36.74±1.00 ^b	1.58±0.03 ^b	1215.00±0.00 ^b
350	301.86±16.16 ^b	462.45±23.72 ^b	34.61±4.72 ^{ab}	1.54±0.11 ^{ab}	1411.80±13.86 ^c
460	282.33±8.59 ^a	416.68±25.46 ^a	32.04±4.91 ^{ab}	1.48±0.11 ^{ab}	1721.50±2.12 ^d
600	324.75±9.43 ^c	514.58±20.40 ^d	36.83±2.60 ^b	1.59±0.07 ^b	1034.00±0.00 ^a
720	331.35±6.39 ^c	492.56±6.37 ^{cd}	32.72±1.45 ^{ab}	1.49±0.03 ^{ab}	1042.00±10.11 ^a

^{a-d} show the significant differences between the samples (P < 0.05)

CONCLUSION

In this study, it was observed that foam mat-microwave drying is a suitable process to obtain egg white powder. The obtained powder can be used as an encapsulating agent in the drying studies and as a food ingredient, especially in the bakery industry due to its foaming and gelling properties. The moisture removal rate, drying rate, and effective moisture diffusivity values increased with an increase in the microwave power, however, the opposite effect was observed for drying time. Page model (R^2 value > 0.983) was chosen as the most suitable model for determining the drying behavior of egg white foam. The average effective moisture diffusivity, average pre-exponential factor, and average activation energy values were calculated to be as $3.3389E-08$ – $1.4139E-07$ m²/s, $1.3635E-07$ m²/s and 28.0640 W/g ($R^2=0.9994$), respectively. The egg white powder showed fair flow characteristic and high cohesiveness. The effect of different storage conditions on the physical, chemical, and powder properties of foam-mat dried egg white powder could be studied in further studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been supported by the Anako Yumurta ve Ürünleri Gıda San. İhr. İth. ve Tic. A.Ş., Ankara, Turkey.

REFERENCES

Abbasi, E., Azizpour, M. (2016). Evaluation of physicochemical properties of foam mat dried

sour cherry powder. *LWT-Food Sci Technol*, 68: 105-110.

Akdoğan, A., Çalışkan Koç, G., Dirim, S.N. (2017). Mathematical modeling of thin-layer microwave drying of corn husk and investigation of powder properties. *Bulg Chem Commun*, 49 (4) 986 – 993.

Alibas, I. (2006). Characteristics of chard leaves during microwave, convective, and combined microwave convective drying. *Drying Technol*, 24(1):1425- 1435.

AOAC. (2000). Official methods of analysis, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg.

Arabhosseini, A., Huisman, W., van Boxtel A., Müller, J. (2009). Modeling of thin layer drying of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Ind Crops Prod*, 29, 1: 53-59.

Ayadi, M.A., Khemakhem, M., Belgith, H., Attia, H. (2008). Effect of Moderate Spray Drying Conditions on Functionality of Dried Egg White and Whole Egg. *J Food Sci*, 73(6):281-287.

Baysal, T., İçier, F., Ersus, S. (2003). Effects of microwave and infrared drying on the quality of carrot and garlic. *Eur Food Res Technol*, 218(1):68–73.

Crank, J. (1975). The Mathematics of Diffusion. 2nd ed. Oxford (UK): Clarendon Press.

Dadali, G., Demirhan, E., Özbek, B. (2007). Color change kinetics of spinach undergoing

- microwave drying. *Drying Technol*, 25(10):1713–1723.
- Demiray, E., Seker, A., Tulek, Y. (2017). Drying kinetics of onion (*Allium cepa* L.) slices with convective and microwave drying. *Heat Mass Transfer*, 53(5), 1817-1827.
- Erbay, Z., Icier, F. (2009). A review of thin layer drying of foods: theory, modeling, and experimental results. *Crit Rev Food Sci*, 50: 441-464.
- Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., (2008). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. powder properties. *Drying Technol*, 26, 726-737.
- Jinapong, N., Suphantharika, M., Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. *J Food Eng*, 84, 194–205.
- Kudra, T., Ratti, C. (2006). Foam-Mat Drying: Energy and Cost Analyses. *Can Biosyst Eng*, 48:27–32.
- Ma, S., Zhao, S., Zhang, Y. Yu, Y., Liu, J., Xu, M. (2013). Quality characteristic of spray-drying egg white powders. *Mol Biol Rep*, 40: 5677.
- Marzec, A., Kowalska, H., Zadrozna, M. (2010). Analysis of instrumental and sensory texture attributes of microwave–convective dried apples. *J Texture Study*, 41, 417–439.
- Maskan, M. (2000). Microwave/air and microwave finish drying of banana. *J Food Eng*, 44, 71-78.
- Moradi, M., Maleki, A., Ghazavi, M.A. (2013). Mathematical Modeling, Moisture Diffusion and Energy efficiency of Thin Layer Drying of Potato. *Int J Agri Crop Sci*, 5(15),1663-1669.
- Muthukumaran, A., Ratti, C., Raghavan, V.G.S. (2008a). Foam-Mat Freeze Drying of Egg White-Mathematical Modeling Part II: Freeze Drying and Modeling. *Drying Technol*, 26(4):513–518.
- Muthukumaran, A., Ratti, C., Raghavan, V.G.S. (2008b). Foam-Mat Freeze Drying of Egg White and Mathematical Modeling Part I Optimization of Egg White Foam Stability. *Drying Technol*, 26(4):508–512.
- Onwude, D.I., Hashim, N., Janius, R.B., Nawi, N.M., Abdan, K. (2016). Modeling the Thin-Layer Drying of Fruits and Vegetables: A Review. *Comp Rev Food Sci Food Saf*, 15, 599-618.
- Ozkan, I.A., Akbudak, B., Akbudak, N. (2007). Microwave drying characteristics of spinach. *J Food Eng*, 78,2: 577-583.
- Narindra, R., Ratti, C. (2010). Foam-Mat Freeze-Drying of Apple Juice Part 1: Experimental Data and Ann Simulations. *J Food Process Eng*, 33(1):268–283.
- Rajkumar, P., Kailappan, R., Viswanathan, R., Raghavan, G.S.V., Ratti, C. (2007). Foam mat drying of alphonso mango pulp. *Drying Technol*, 25(2):357- 365.
- Sadeghi, M., Mirzabeigi Kesbi, O., Mireei, S.A. (2013). Mass transfer characteristics during convective, microwave and combined microwave-convective drying of lemon slices. *J Sci Food Agric*, 93, 471–478.
- Salahi, M.R., Mohebbi1, M., Taghizadeh, M. (2015). Foam-mat drying of cantaloupe (*cucumis melo*): Optimization of foaming parameters and investigating drying characteristics. *J Food Process Pres*, 39: 1798-1808.
- Sharada, S. (2013). Studies on Effect of Various Operating Parameters & Foaming Agents- Drying of Fruits and Vegetables. *International Journal of Modern Engineering Research (IJMER)*, 3(3):1512–1519.
- Solval, K.E.M. (2011). Spray drying technology for the production and processing of microencapsulated omega-3 fish oil with egg powder, Master Thesis, 1390. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, USA
- Tekin, Z.H., Baslar, M. (2018). The effect of ultrasound-assisted vacuum drying on the drying rate and quality of red peppers. *J Therm Anal Calorim*, 132(2), 1131–1143.
- Venkatachalam S., Sangamithra A., John S.G., Kuppaswamy, K. (2014). Foam mat drying of food materials: a review. *J Food Process Preserv*, 39: 3165-3174.

Wang, Z., Sun, J., Chen, F., Liao, X., Hu X. (2007). Mathematical modelling on thin layer microwave drying of apple pomace with and without hot air pre-drying. *J Food Eng*, 80:536–544.

Wang, Y., Zhang, M., Adhikari, B., Mujumdar, A.S., Zhou, B. (2013). The application of

ultrasound pretreatment and pulse- spouted bed microwave freeze drying to produce desalted duck egg white powders. *Drying Technol*, 31: 1826–1836.



**ASSESSMENT OF SOME PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL
QUALITY PARAMETERS OF RAW MEATBALLS PREPARED WITH HIGH
PRESSURIZED MEAT**

Sinan Uzunlu*

Alanya Alaaddin Keykubat University Rafet Kayış Engineering Faculty, Department of Food Engineering,
Alanya, Antalya, Turkey

Received/Geliş: 03.01.2019; Accepted/Kabul: 17.03.2019; Published online/Online baskı: 27.03.2019

Uzunlu, S. (2019). Assessment of some physicochemical and microbiological quality parameters of raw meatballs prepared with high pressurized meat. GIDA (2019) 44 (2): 340-347 doi: 10.15237/gida.GD18119

Uzunlu, S. (2019). Yüksek basınç uygulanmış etle hazırlanan çiğ köftelerin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalite parametrelerinin değerlendirilmesi. GIDA (2019) 44 (2): 340-347 doi: 10.15237/gida.GD18119

ABSTRACT

Raw Meatball (Çiğ Köfte) is a traditional Turkish food prepared from raw beef or lamb meat, bulgur, tomato and/or pepper paste, spices, and condiments that is treated with any process and consumed raw. In this study, high hydrostatic pressure (HHP) was applied to post-rigor minced beef meat at 50–300 MPa for 20 mins at room temperature to improve safety of Çiğ Köfte. Physicochemical (a_w , moisture, pH, and colour) and total aerobic mesophilic bacteria analyses were performed on both minced beef and raw meatball samples. Significant ($P < 0.05$) differences caused by the HHP treatment were observed in the physicochemical and microbial analyses: Total aerobic mesophilic bacteria counts decreased as HHP levels increased. Therefore, it is concluded that HHP treatment is a promising process for preparing Çiğ Köfte while maintaining its traditional recipe. The application of the current study is expected therefore, would be a new insight for ready-to-eat food sector.

Keywords: Food safety, high hydrostatic pressure, raw meatball

**YÜKSEK BASINÇ UYGULANMIŞ ETLE HAZIRLANAN ÇİĞ KÖFTELERİN
BAZI FİZİKOKİMYASAL VE MİKROBİYOLOJİK KALİTE
PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ÖZ

Geleneksel bir Türk gıdası olan Çiğ Köfte dana veya koyun eti, bulgur, domates ve/veya biber salçası, baharat ve çeşniler ile hazırlanmakta ve hiçbir prosese tabi tutulmadan çiğ olarak tüketilmektedir. Bu çalışmada, Çiğ Köftenin güvenliğinin artırılması için post-rigor dana kıyma etine 50-300 MPa'da 20 dakika oda sıcaklığında yüksek hidrostatik basınç uygulanmıştır. Dana kıyma eti ve Çiğ Köfte örneklerinde fizikokimyasal (a_w , nem, pH ve renk) analizler ile toplam aerobik mezofilik bakteri analizleri yapılmıştır. Yüksek hidrostatik basınç uygulanması fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizlerde önemli ($P < 0.05$) değişikliklere neden olmuştur. Toplam aerobik mezofilik bakteri sayıları yüksek hidrostatik basınç değerleri arttıkça azalma göstermiştir. Bu nedenle, Çiğ Köftenin geleneksel formülasyonunu koruyarak hazırlanmasında yüksek hidrostatik basınç uygulamasının gelecek vaat eden bir proses olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada yer verilen uygulamanın tüketime hazır gıda sektörüne yeni bir bakış açısı getireceği beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Gıda güvenliği, yüksek hidrostatik basınç, Çiğ Köfte

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ sinan.uzunlu@alanya.edu.tr,

☎ (+90) 242 510 6120,

☎ (+90) 242 510 6124

INTRODUCTION

High hydrostatic pressure, irradiation, pulsed electric fields, high-intensity light pulses are among the non-thermal technologies. Some foods are requiring to be processed with these technologies because of avoiding negative effect of thermal treatment, such as non-enzymatic browning, accumulation of undesirable compounds (furfural, acrylamide, etc.) and nutritional and sensorial losses (San Martín et al., 2002). Çiğ Köfte is one of these foods that requires a non-thermal technology to conserve its originality. Because it is prepared from raw meat and consumed as is, in several hours. This traditional raw meatball appetizer called Çiğ Köfte is commonly consumed in Turkey. It is prepared with raw minced beef or lamb meat, bulgur, tomato and/or pepper paste, spices, and condiments. Consumers are strictly advised to cook meat due to its high perishability and food poisoning risk, however Çiğ Köfte is prepared from raw meat, which raises major food safety concerns (Var and Kabak, 2005).

Due to the time-consuming nature of its preparation, consumers prefer to buy Çiğ Köfte from markets. Moreover, in the last decade Turkish regulations prohibited the sale of Çiğ Köfte that contains raw meat. However, consumer interest in Çiğ Köfte endures and the popularity of a meatless form of the dish has recently increased to follow the sensorial perception of the product. Çiğ Köfte is traditionally prepared and consumed during a folk ceremony that includes music in a process that lasts no more than two hours. A new processing method for raw meat is therefore needed to increase the level of food safety for Çiğ Köfte preparation.

High hydrostatic pressure (HHP) is the most popular cold pasteurisation process used in non-thermal technologies (Mert et al., 2013). Pressure is usually applied in a range of 100–1000 MPa (Bárceñas et al., 2010). The quality of pressurised foods has been documented to be better than thermally pasteurised products (San Martín et al., 2002), and regulatory agencies in several countries (including the United States) have approved its

commercial use (Bermúdez-Aguirre and Barbosa-Cánovas, 2011).

The aim of the current study was to assess the quality of Çiğ Köfte that prepared with HHP-treated with meat. Because, there was a need to implement a non-thermal technology to prepare a safe Çiğ Köfte. The HHP treatment was applied to post-rigor minced beef at 50–300MPa for 20 mins at room temperature, and the physicochemical (aw, moisture, pH, colour) and microbiological parameters of the fresh meat were determined.

MATERIALS AND METHODS

Peptone water 0.1%, tryptic soy agar (TSA), and 1,2-Propanediol were used (Sigma-Aldrich, United Kingdom). Minced beef, onion, spring onion, tomato paste, black pepper, and salt were purchased from local markets in Reading (United Kingdom). Meat samples were purchased from two different retailers. Bulgur and gamma-irradiated red pepper were purchased from Antalya (Turkey).

High hydrostatic pressure treatments

Fifty grams of minced beef samples were sealed in polyethylene (PE) bags using a Multivac A300 instrument. Samples were placed in a Stansted high-pressure rig (Stansted Fluid Power Ltd, Stansted, United Kingdom). 1,2-Propanediol was used as a pressurizing medium. Minced beef samples were then separately pressure treated at 50 MPa, 100 MPa, 200 MPa, and 300 MPa for 20 mins at room temperature at the University of Reading Food and Nutritional Sciences Department's food processing centre. High pressurized meat samples were then divided into two groups. (I) Raw meat ball (Çiğ Köfte), and (II) Minced beef.

Preparation of the Çiğ Köfte samples

To determine the contribution of ingredients (other than minced beef) to the microbiological load of Çiğ Köfte, group (I) was used in Çiğ Köfte preparation, while the remained group (II) was evaluated as its control and kept at 4°C until further analyses. The following materials were used to prepare the Çiğ Köfte samples: bulgur

(36.43%), minced beef (29.13%), onion (11.65%), irradiated red pepper (8.74%), tomato paste (7.28%), spring onion (5.83%), salt (0.73%), and black pepper (0.21%). The onion and spring onion were chopped and dipped in a citric acid–water solution (2.5% w/v) for 1 hr to decrease the amount of initial microbial flora. All materials were hand kneaded for about half an hour on a metallic bench. Samples were then aseptically placed in PE bags and sealed using a Multivac A300 packaging unit at the food processing centre. Duplicate bags were sampled in analyses.

Physicochemical analyses

A Rotronic HygroLab C1 (Bassersdorf, CH) instrument was used to conduct a_w (water activity) measurements at a temperature of 20°C. A Mettler Toledo HE53 (Port Melbourne, Australia) Moisture Analyzer (set at 105°C) was used to determine the samples' moisture content, and ColorQuest (Hunter Lab, United States) was used to measure the samples' colour (the reflectance mode was set, the observation angle was 10°, and the illuminant was IIIA). Reflectance specula included, the measuring spot size was 9 mm. Triplicate readings were evaluated for CIE L^* (lightness), a^* (redness), and b^* (yellowness) parameters. Ten grams of each sample were homogenised in 90 mL of distilled water to determine their pH values, which were recorded using a pH meter (SevenEasy, Mettler Toledo) averaging three measurements (AOAC, 2000).

Microbiological analysis

A total of 10-g samples were weighed in sterile stomacher bags containing 90 mL of peptone water (0.1%) and homogenised in a stomacher (Seward 400, UK) at 230 rpm for 2 min. Serial decimal dilutions were prepared and spread onto the TSA. Plates were incubated at 37°C for 24–48 hr prior to counting colonies. TSA was used according to the reference; (Clavero and Beuchat, 1995).

Statistical analysis

Each trial was repeated twice, and duplicate samples were tested at each sampling time. In order to determine the effect of HHP treatment, an analysis of variance (ANOVA) was conducted

to evaluate the data using SPSS, version 21 (IBM, United States). Duncan's post hoc test was applied at a significance level of $P < 0.05$ (Steel and Torrie, 1980).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, it is found that preparation of Çiğ Köfte from HHP-treated meat is a new and contributively finding. In the colour analyses, CIE L^* values were lowered by decreased levels of HHP treatment, indicating that the samples became darker when less pressure was applied. The lower pressure values for both sample sets (raw meatball and minced beef) were found to be similar to the control group's (untreated samples) values, meaning that lightness was lower than in the samples that were exposed to increased levels of pressurisation. Differences were found significant ($P < 0.05$) among each sample set of L^* values (Table 1). L^* values of the minced beef samples were found to be higher than those of the raw meatball samples.

It has already been stated that HHP treatment results in changes to the lightness of meat at pressures of 200–400 MPa (Jung et al., 2003). The findings—that L^* values increased from 200 to 300 MPa—agreed with this. Moreover, the addition of ingredients (e.g., tomato paste and red pepper) eliminated colour losses. This is consistent with a similar study of Uzunlu and Niranjana (2016)'s findings, which were observed visually. Where, they treated minced beef samples for use in a raw meatball preparation with 400 MPa of pressure for 15 min at 22°C. In earlier studies of raw meatballs, both Dogan et al. (2014) and Kozan and Sariçoban (2016) found higher L^* values in their control group samples (prepared by tap water) compared to ours. These differences are likely the result of the different formulations (including materials and proportions) used in each study.

The redness (CIE a^*) of the samples was found to be similar for the raw meatball samples. However, different pressures of HHP treatment resulted in significant ($P < 0.05$) differences between minced beef samples. The a^* values decreased as levels of HHP treatment increased, indicating that the

redness of the meat samples was lost when exposed to greater pressure (Table 1). The redness of the minced beef samples decreased after 100–300 MPa of HHP treatment, it was higher at 50 MPa of treatment compared to the control samples. For the preparation of Çiğ Köfte, the consumers who buy meat pay attention to their original reddish colour. For this reason, high-pressure processors must consider the pressure

level. For example, moderate pressures (e.g., 130 MPa) improve meat colour by increasing redness during the first few days of chilled storage (Jung et al., 2003), which is why the current research investigated low-pressure (50- and 100-MPa) application for retail purpose. However, higher pressures (>130 MPa) are required to sanitise meat in industrial usage; therefore, pressures of 200 and 300 MPa were used in the current study.

Table 1. Physicochemical and microbial changes of RMB and MB as affected by HHP ^a

	Control	50 MPa	100 MPa	200 MPa	300 MPa
<i>a_w</i>					
RMB	0.93±0.00	0.93±0.00	0.94±0.01	0.95±0.02	0.93±0.00
MB	0.96±0.01	0.97±0.00	0.97±0.00	0.97±0.00	0.98±0.00
Moisture (%)					
RMB	27.14±1.35	24.92±1.63	28.74±1.3	26.73±1.22	26.78±0.31
MB	33.22±0.07 ^a	33.66±0.37 ^a	36.41±1.03 ^b	34.78±0.73 ^{ab}	36.97±0.49 ^b
pH					
RMB	5.17±0.01 ^b	5.1±0.00 ^a	5.1±0.00 ^a	5.15±0.02 ^{ab}	5.16±0.01 ^b
MB	5.58±0.02 ^b	5.49±0.00 ^a	5.51±0.02 ^a	5.51±0.02 ^a	5.54±0.01 ^{ab}
<i>L[*]</i>					
RMB	33.12±1.53 ^b	33.15±0.12 ^{ab}	35.10±0.83 ^{ab}	35.52±0.03 ^{ab}	36.16±0.05 ^a
MB	37.96±0.03 ^{bc}	37.29±1.00 ^c	38.28±0.83 ^{ac}	40.66±0.11 ^b	44.92±0.09 ^a
<i>a[*]</i>					
RMB	8.85±1.24	10.24±0.76	9.45±0.08	9.52±0.39	9.42±0.63
MB	12.17±0.26 ^{ab}	13.14±0.69 ^b	11.30±0.40 ^{ab}	11.65±0.32 ^{ab}	10.14±1.51 ^a
<i>b[*]</i>					
RMB	6.14±0.16 ^b	7.22±0.09 ^a	7.39±0.23 ^a	7.81±0.24 ^a	7.47±0.10 ^a
MB	4.54±0.26 ^b	5.30±0.15 ^a	5.50±0.24 ^a	5.27±0.30 ^a	5.65±0.17 ^a
TAMB					
RMB	6.05±0.15 ^a	5.31±0.25 ^b	4.50±0.255 ^c	3.60±0.055 ^d	0.15±0.05 ^e
MB	6.00±0.095 ^a	5.23±0.035 ^b	4.14±0.09 ^c	3.23±0.015 ^d	0.1±0.00 ^e

^a Values are means ± SD.

Values in rows with different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). No letters indicate no significant differences ($P > 0.05$) in rows.

RMB: Raw meatball, MB: Minced beef, TAMB: Total aerobic mesophilic bacteria (expressed as log CFU/g)

The yellowness (CIE b^*) of both sample sets decreased when lower levels of pressure were applied. The yellowness of the raw meatball samples was higher than that of the minced beef samples, and the HHP treated samples were significantly ($P < 0.05$) different than the control samples indicating that yellowness were higher than control samples (Table 1). Although, the a^* values of meat form a more significant parameter than b^* values according to consumer choice, the

addition of ingredients such as bulgur (boiled and pounded wheat product) resulted in higher b^* levels in the raw meatball samples. Both Dogan et al. (2014) and Kozan and Sariçoban (2016) found the b^* values of the raw meatball samples in their control groups to be higher than ours, which is related to the different formulations used.

The a_w values of the minced beef samples were found to be higher than those of the raw

meatballs (Table 1). It is likely that the highly crude materials (e.g., bulgur, paste, and spices) added to the minced beef became bound to free water, leading to decreased values (0.4 ± 0.1 unit lower). Doğan et al. (2014) and Kozan and Sarıçoban (2016) reported a_w values of 0.94 and 0.94–0.95, respectively, for their raw meatball control samples, both of which are very close to the current reported values. While there were no significant differences to the moisture content of the raw meatball samples, significant differences ($P < 0.05$) were observed in the minced beef samples according to the level of pressure used. The HHP treatment resulted in an increase to the moisture content of the minced beef samples. For example, a 4% increase was observed in the sample that was exposed to the highest level of pressure (300 MPa) compared to the control sample. As reported already, the HHP treatment resulted in increases to water content caused by drip losses (Jung et al., 2003). Both Doğan et al. (2014) and Kozan and Sarıçoban (2016) reported moisture content levels about twice as high as those found in the current study; this was caused by the amount of water used in their formulations. Different levels of HHP treatment resulted in significantly different ($P < 0.05$) pH values for each sample set (raw meatball and minced beef). While these differences were significant, the pH values for each sample set remained very close. In keeping with the previously documented pH of post-rigor meat (5.4–5.8), it is found that a pH level of 5.5 in the minced beef samples. The addition of ingredients to minced beef during the preparation of raw meatballs resulted in a pH decrease of about 0.4 units. However, Erol et al. (1993), Uzunlu and Yıldırım (2003), Doğan et al. (2014), Kozan and Sarıçoban (2016) have reported the pH of raw meatball samples to be between 5.5–5.8. This difference could be attributed to the water used in their formulations, which was omitted from the recipe.

Meat and fish species are susceptible to oxidation caused by HHP treatment, which could be perceived by a sensory panel. Both the metal (primarily iron) ions and free radicals released by the pressure treatment are responsible for this increased rate of oxidation (Ma and Ledward,

2013). In a similar study, Uzunlu and Niranjana (2016) treated minced beef samples for use in a raw meatball preparation with 400 MPa of pressure for 15 min at 22°C. However, this level (400 MPa) stands for a critical pressure by making the polyunsaturated fatty acids in the fresh meat more susceptible to oxidation. If 400 MPa upward is required, metal chelating agents, such as ethylene diamine tetra acetate (EDTA), might be used to effectively inhibit increases to lipid oxidation (Ma and Ledward, 2013). Gecgel (2013) identified C18:1 and C18:2 as the main unsaturated fatty acids in raw meatballs and found that storage at 4°C for three weeks resulted in a very negligible (0.05) decrease to the percentage of total polyunsaturated fatty acids present (Gecgel, 2013).

One important parameter for the sensorial judgment of meat is its tenderness. Ma and Ledward (2013) reported that the use of moderate pressures (100–200 MPa) and high temperatures (60–70°C) tenderised post-rigor meat better than treatments at room temperature. This practice could be adopted by raw meatball vendors. Although the meat might appear cooked after such a treatment, the addition of ingredients (tomato paste, red pepper, bulgur) could mask that appearance if consumers like the Çiğ Köfte at sensory evaluation of further research.

Total aerobic mesophilic bacteria counts were substantially affected by the HHP treatment. The growth of microorganisms decreased as the level of HHP treatment increased. For both sample sets, different levels of HHP treatment resulted in significant ($P < 0.05$) differences (Table 1). Earlier studies have reported that Çiğ Köfte has a high microbial load, which is consistent with the current findings. For instance, total aerobic mesophilic bacteria were reported in the range of 4–7 logs, and coliform group bacteria and *Staphylococcus aureus* were reported in the range of 2–5 logs (Pekel et al., 2003; Uzunlu et al., 2004; Ardic and Durmaz, 2008; Cetin et al., 2008; Cetinkaya et al., 2012; Dogan et al., 2014). However, the threat to public health comes not only from the indigenous microbial load found in Çiğ Köfte but also from food handlers' improper

hygienic practices. For example, in a study of the recently introduced meatless form of Çiğ Köfte, Taban (2012) found that 12 of the 70 samples purchased in Ankara, Turkey were contaminated with *Listeria monocytogenes*.

Proper hygienic practices are required to increase the safety of Çiğ Köfte consumption. However, the source of risk from raw meat majorly could be removed by using HHP or partly be removed by using natural antimicrobials. One such study reported that plum sauce and pomegranate sauce resulted to one log cycle decrease in Çiğ Köfte samples when compared to control samples (Var and Kabak, 2005). Again, using yoghurt or yoghurt serum inhibited growth of Coliform group bacteria and *S. aureus* in Çiğ Köfte samples, while showed slight antimicrobial effect on total aerobic mesophilic bacteria (Dogan et al., 2014).

The reason that the current study made use of elevated pressure levels (200–300 MPa) at room temperature was to provide microbiological safety to the meat used to prepare Çiğ Köfte so that it could be safely consumed raw, as is tradition. The use of an HHP treatment at 300 MPa resulted in a 6 decimal microbial reduction, which achieved the targeted levels (5-log) of safety in the Çiğ Köfte samples. This level of pressure meets the 5-log microbial reduction specified by the National Advisory Committee on the Microbiological Criteria for Foods (NACMCF), which was released for high-pressure processors (Daryaei and Balasubramaniam, 2012). In addition, the 300-MPa treatment falls in the range of 300–600 MPa, which has been found to cause the inactivation levels of vegetative cells to increase (Rastogi et al., 2007). Conversely, the 200-MPa treatment provided only a 3-log decrease of cells. However, a 200-MPa treatment would be enough to sanitise a meat product with an indigenous microbial load of 3 logs at the time of sale. Uzunlu and Niranjana (2016) found 3 logs of indigenous load in minced beef that was to be used to prepare Çiğ Köfte. Additionally, they reported that a 400-MPa treatment inactivated this initial microbial load (Uzunlu and Niranjana, 2016). The current study found that the 50- and 100-MPa treatments

resulted in decreases of 0.8 and 1.8 logs, respectively.

Spore-forming bacteria are another threat to food safety posed by raw meat consumption because bacterial spores are highly resistant to high pressures (above 1200 MPa). Therefore, thermally assisted HHP (using a thermal treatment during the HHP treatment) and non-thermal methods, such as a pre-treatment ultrasound, should be evaluated for microbial safety (Rastogi et al., 2007). As is stressed by Rastogi et al. (2007), HHP treatment should not be considered a replacement for traditional processing methods.

CONCLUSIONS

The current study used low levels of pressure (50 and 100 MPa) to prevent the loss of redness in raw meat for retail purposes; however, these levels of HHP treatment were insufficient to inactivate 6 logs of the minced meat samples' initial microbial load. Elevated levels of pressure (200 and 300 MPa) were therefore used to substantially decrease the microbial load in order to create a treatment suitable for industrial (i.e., catering) purposes. While a loss of redness occurs in meat processed at these elevated pressures, the Çiğ Köfte prepared is safer for consumption than the untreated (control) samples and its original appearance remains protected owing to the ingredients added (i.e. tomato paste, red pepper). Therefore, it is found that HHP to be an effective process for the preparation of Çiğ Köfte.

ACKNOWLEDGEMENTS

Author thanks to sending institution (Pamukkale University) to the U.K., and Professor Keshavan Niranjana, Dr Sameer Khalil Ghawi and Dr Jonathan Swann at the University of Reading (U.K.) are appreciated for providing facilities and their technical assistance.

REFERENCES

- AOAC (2000). Official methods of analysis of international. 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, USA.
- Ardic, M., Durmaz, H. (2008). Determination of changes occurred in the microflora of çig köfte (raw meat balls) at different storage temperatures.

- Int J Food Sci Technol*, 43(5): 805–809. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01519.x.
- Bárceñas, M.E., Altamirano-Fortoul, R., Rosell, C.M. (2010). Effect of high pressure processing on wheat dough and bread characteristics. *LWT - Food Sci Technol*, 43(1): 12–19. Doi: 10.1016/j.lwt.2009.06.019.
- Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G.V. (2011). An Update on High Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications. *Food Eng Rev*, 3(1): 44–61. Doi: 10.1007/s12393-010-9030-4.
- Cetin, O., Bingol, E.B., Akkaya, H. (2008). The microbiological, serological and parasitological quality of Cig Kofte (Raw Meatball) and its lettuce marketed in Istanbul. *Pol J Environ Stud*, 17(5): 701-706.
- Cetinkaya, F., Mus, T.E., Cibik, R., Levent, B., Gulesen, R. (2012). Assessment of microbiological quality of cig kofte (raw consumed spiced meatball): Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella*. *Food Control*, 26(1): 15–18. Doi: 10.1016/j.foodcont.2012.01.001.
- Clavero, M.R.S., Beuchat, L.R. (1995). Suitability of selective plating media for recovering heat- or freeze stressed *Escherichia coli* O157:H7 from tryptic soy broth and ground beef. *Appl Environ Microbiol*, 61(9): 3268-3273.
- Daryaei, H., Balasubramaniam, V.M. (2012). Microbial decontamination of food by high pressure processing. In: *Microbial decontamination in the food industry*, Demirci, A., Ngadi, M.O. (eds), Woodhead Publishing Limited, Cambridge (UK), pp. 370-406.
- Dogan, M., Cankurt, H., Toker, O.S., Yetim, H., Sagdic, O. (2014). Effect of yoghurt or yoghurt serum on microbial quality of cig kofte. *J Food Sci Technol*, 51(7): 1406–1410. Doi: 10.1007/s13197-012-0649-4.
- Erol, I., Mutluer, B., Vatansver, L. (1993). A tipi enterotoksin oluşturan *Staphylococcus aureus*'un çiğ köftede üreme ve toksin oluşturma yeteneğinin belirlenmesi. *GIDA* 18(5): 315-318.
- Gecgel, U. (2013). Changes in some physicochemical properties and fatty acid composition of irradiated meatballs during storage. *J Food Sci Technol*, 50(3): 505-513. Doi: 10.1007/s13197-011-0375-3.
- Jung, S., Ghoul, M., De Lamballerie-Anton, M. (2003). Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat. *LWT - Food Sci Technol*, 36(6): 625–631. Doi: 10.1016/S0023-6438(03)00082-3.
- Kozan, H.I., Saricoban, C. (2016). The effects of addition of lemon and pomegranate peel at different levels on the physicochemical properties of cig kofte during storage. *JMAS*, 4(1): 68-78.
- Ma, H., Ledward, D.A. (2013). High pressure processing of fresh meat - Is it worth it? *Meat Sci*, 95(4): 897–903. Doi: 10.1016/j.meatsci.2013.03.025.
- Mert, M., Buzrul, S., Alpas, H. (2013). Effects of high hydrostatic pressure on microflora and some quality attributes of grape juice. *High Pressure Res*, 33(1): 55-63. Doi: 10.1080/08957959.2012.763035.
- Pekel, C., Var, I., Kabak, B., Şener, A., Burcu, Ö. (2003). Çiğ köftelerin mikrobiyolojik kalitesi. I. Bölgesel Öğrenci Gıda Sempozyumu Adana'03, 17-18 Nisan Adana, Türkiye, 1-6 s.
- Rastogi, N.K., Raghavarao, K.S.M.S., Balasubramaniam, V.M., Niranjan, K., Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(1): 69–112. Doi: 10.1080/10408390600626420.
- San Martín, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson B.G. (2002). Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 42(6): 627-645. Doi: 10.1080/20024091054274.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H. (1980). *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill International Book Company, Tokyo, 633 p.
- Taban, B.M. (2012). *Listeria monocytogenes* in cig kofte without meat: A novel bulgur ball product. *J Food Agric Environ*, 10(2): 130–132.

Uzunlu, S., Yıldırım, I. (2003). Çiğ köftenin mikrobiyolojik kalitesi ve farklı muhafaza sıcaklık ve sürelerindeki mikrobiyal değişiminin incelenmesi. *GIDA* 28(5): 553-558.

Uzunlu, S., Yıldırım, I., Serdengeçti, N. (2004). Antalya il merkezinde tüketime sunulan Çiğ Köftelerin mikrobiyolojik kalitesinin incelenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 34: 257-261.

Uzunlu, S., Niranjan, K. (2016). High hydrostatic pressure inactivation of total aerobic bacteria in

raw meatball. *Pamukkale Univ Mub Bilim Derg*, 22(7): 625-628. Doi: 10.5505/pajes.2016.93357.

Var, I., Kabak, B. (2005). Çiğ Köfte yapımında erik ekstraktı, nar ekşisi, ve limon suyu kullanımının antimikrobiyal etkilerinin araştırılması. Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Sonuç Raporu ZF/2003/YL49, Adana, Türkiye, 27 s.

BIOMONITORING OF SOME PERSISTENT ORGANOCHLORINE CONTAMINANTS IN THE MILK OF ANATOLIAN WATER BUFFALOES

Enes ATMACA*

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey

Received/Geliş: 11.01.2019; Accepted/Kabul: 18.03.2019; Published online/Online baskı: 27.03.2019

Atmaca, E. (2019). *Biomonitoring of some persistent organochlorine contaminants in the milk of anatolian water buffaloes*. GIDA (2019) 44 (2): 348-356 doi: 10.15237/gida.GD19020

Atmaca, E. (2019). Anadolu mandası sütlerinde bazı kalıcı organik klorlu kirleticilerin biyoizlenmesi. GIDA (2019) 44 (2): 348-356 doi: 10.15237/gida.GD19020

ABSTRACT

In this study, 50 raw milk samples of Anatolian water buffalo (*Bubalus bubalis*, Linneaus, 1758) belonging to different dairy farmers in the Kızılırmak Delta in Samsun, Turkey, were investigated for contamination by 9 organochlorine pesticides (OCPs) and 16 polychlorinated biphenyls (PCBs). The contaminants were extracted cryogenically from the milk fat and their concentrations were determined with a gas chromatography-electron capture detector (GC-ECD). The mean level of alpha-hexachlorocyclohexane (HCH) in the milk samples was 6.34 ng/g/fat, beta-HCH was 20.41 ng/g/fat, gamma-HCH was 9.77 ng/g/fat, \sum DDTs was 18.11 ng/g/fat and \sum Indicator-PCBs was 127.27 ng/g/fat. The mean values, except for aldrin and \sum DDTs, were above the maximum residue limits (MRLs) stated in the European Commission (EC) Regulations and Turkish Food Codex (TFC). Regular monitoring and reporting of the levels of persistent organochlorines in the meat, milk and processed products of water buffaloes is essential for the assessment of human, animal and environmental health.

Keywords: Biomonitoring, organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, water buffalo milk.

ANADOLU MANDASI SÜTLERİNDE BAZI KALICI ORGANİK KLORLU KİRLETİCİLERİN BİYOİZLENMESİ

ÖZ

Bu çalışmada, Samsun Kızılırmak deltasındaki farklı yetiştiricilere ait mandalardan (*Bubalus bubalis*, Linneaus, 1758) toplanan 50 çiğ süt örneğinde, çevresel kontaminasyonu belirlemek için 9 organik klorlu pestisit ve 16 poliklorlu bifenil bileşik kalıntısı araştırıldı. Süt yağından kriyojenik yöntemle ekstrakte edilen analitlerin düzeyleri elektron yakalama detektörlü gaz kromatografi (GC-ECD) ile ölçüldü. Süt örneklerinde ortalama alfa-HCH düzeyi 6.34 ng/g/yağ, ortalama beta-HCH 20.41 ng/g yağ, ortalama gamma-HCH 9.77 ng/g/yağ, ortalama \sum DDT 18.11 ng/g/yağ ve ortalama \sum İndikatör-PCB 127.27 ng/g/yağ olarak tespit edildi. Aldrin ve \sum DDT dışındaki miktarlar Avrupa Birliği Yönetmelikleri ve Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen değerlerin üzerinde bulundu. Çevrede uzun yıllar etkinliklerini koruyabilen kalıcı organik klorlu bileşiklerin mandalardan elde edilen et, süt ve işlenmiş hayvansal ürünlerde düzenli aralıklarla izlenmesi ve bildirilmesi insan, hayvan ve çevre sağlığının değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Biyoizleme, organik klorlu pestisitler, poliklorlu bifeniller, manda sütü.

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ eatmaca@omu.edu.tr

☎ (+90) 362 312 1919

☎ (+90) 362 457 6922

INTRODUCTION

Organochlorine contaminants (OCs) like hexachlorobenzene (HCB), the insecticide dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) or its persistent metabolite p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) as well as the polychlorinated biphenyls (PCB) are substances that are characterised by their high lipophilicity and high bioaccumulative potential (Schettgen et al., 2015). They enter the atmosphere in numerous ways such as urban runoff, municipal sewage, industrial waste, outflow from agricultural area, chemical spill and transport (El-Shahawi et al., 2010; Hong et al., 2003). Once released in the environment they resist for physical, biological, chemical and photochemical breakdown processes and thus persist in the environment (Mrema et al., 2013). The persistency of the compounds allows them to accumulate in animals, particularly in the fat cells (El-Shahawi et al., 2010). These substances are still of environmental concern despite the worldwide ban on their production and use in the framework of the Stockholm Convention (Stockholm Convention, 2001). Exposure to these persistent chemicals has been associated with various disorders including cancer (Medrado-Faria et al., 2000; Muscat et al., 2003), reproductive diseases (Porpora et al., 2009) and neurobehavioral effects (Colosio et al., 2003). It has been reported that these effects are related to their ability to disrupt the functions of certain hormones, enzymes, growth factors and neurotransmitters in the organism (Mrema et al., 2013).

The human population is exposed to OCPs and PCBs through several ways, food being the major route of exposure (Mrema et al., 2013). Buffalo milk is a preferential food source in different parts of the world and the second most consumed milk in the worldwide and in Europe. Italy, Turkey, Bulgaria and Greece are the countries where the largest amounts of buffalo milk being produced (Pasquini et al., 2018).

Fat content is higher in buffalo milk than in cow milk (Ménard et al., 2010) and the fat ratio of Anatolian water buffalo milk ranged from 5.91%

to 8.15% with an average of 7.09% (Yilmaz et al., 2017). The high fat content of buffalo milk makes it highly suitable to accumulate persistent organochlorinated chemicals due to their lipophilicity. Although there is a public concern on the use of pesticides, yet studies on residual levels in water buffalo milk and their effects are limited (Abbassy, 2017; Aslam et al., 2013; Barman and Mishra, 2015; Bulut et al., 2011; John et al., 2001; Makadiya and Pandey, 2017; Sajid et al., 2016; Shaker and Elsharkawy, 2015), even there is no data in the national summary reports on pesticide residue analysis in food performed by European Food Safety Authority (EFSA) (EFSA, 2018). Therefore, monitoring of residues of pesticides and organochlorine contaminants in water buffaloes milk can provide data about the types and quantities of these hazardous compounds in the environment as well as in the milk. In this study, milk of Anatolian water buffaloes has been examined because the Kızılırmak Delta is one of the most important regions in Turkey for the breeding of Anatolian water buffaloes and the production of milk and milk products. Therefore, urgent efforts should be undertaken to determine the sources of the contaminants and then apply practical measures to reduce the levels of all the contaminants in the milk fat below the stated MRLs.

MATERIALS AND METHODS

A total of 50 raw milk samples from individually different Anatolian water buffaloes were collected, belonging to different dairy farmers in the Kızılırmak Delta in Samsun, Turkey, in September 2017. Milk samples were stored at -80 °C until analysis.

The cryogenic extraction of the OCPs and PCBs from the samples was performed according to the method stated by Bordet et al. (2002). For the cleanup, two types of ready-to-use cartridges (C₁₈ and Florisil, Phenomenex, USA) were used. The method used by Aksoy et al. (2011) was utilized for the analyses of the samples with the GC-ECD. The injection block temperature was 260 °C and the injection mode was set as splitless. The flow rate of the nitrogen used as the carrier gas was set at 1.5 mL/min. The column (TRB-1, Teknokroma, Spain) was 60 m x 0.32 mm i.d. x

0.25 μm (phenyl methyl silicone) and the initial temperature of the column oven was 100 °C. The process conditions of the column were the following: initial oven temperature 100 °C (3 min), 10 °C/min to 200 °C (maintained for 3 min), 3 °C/min to 225 °C (maintained for 3 min), 2 °C/min to 270 °C (maintained for 3 min) and 1 °C/min to 275 °C (maintained for 10 min). The ECD temperature was set at 280 °C. Total analysis time was 67.83 minutes.

Nine OCP (alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH (lindane), HCB, aldrin, DDT and its metabolites (2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT)) and 16 PCB (PCB 28, PCB 52, PCB 70, PCB 74, PCB 81, PCB 99, PCB 101, PCB 118, PCB 128, PCB 138, PCB 153, PCB 156, PCB 170, PCB 180, PCB 187 and PCB 208) standards (Dr. Ehrenstorfer, Germany) were prepared at 7, 10,

30, 70, 100 and 300 ng/g and then injected into the GC-ECD. The OCPs and PCBs were added to milk fat at 25, 50 and 100 ng/g levels to determine the recovery percentages. The limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were calculated automatically by the device's software (Shimadzu, Japan) using the standard chromatograms.

RESULTS AND DISCUSSION

Retention times, LOD and LOQ values, and recovery percentages of the OCPs and PCBs, are given in Table 1, residual levels of the OCPs and PCBs in the milk samples are given in Table 2, the mix standard chromatogram of the compounds shown in Figure 1 and the mix spiked chromatogram of the compounds is shown in Figure 2.

Table 1. Retention times, LOD and LOQ values, and recovery percentages of the OCPs and PCBs

Compound	Retention time (min)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Recovery (%)
alpha-HCH	19.362	0.016	0.053	60
beta-HCH	19.989	0.035	0.117	82
HCB	20.117	0.018	0.060	48
gamma-HCH	20.713	0.018	0.060	74
PCB 28	23.640	0.184	0.613	63
PCB 52	25.446	0.298	0.993	89
Aldrin	26.862	0.021	0.070	55
PCB 74	28.940	0.218	0.727	65
PCB 70	29.137	0.221	0.737	63
2,4'-DDE	30.852	0.038	0.127	54
PCB 101	31.125	0.146	0.487	90
PCB 99	31.502	0.232	0.773	58
PCB 81	32.866	0.341	1.137	76
4,4'-DDE	33.072	0.027	0.090	82
PCB 118	35.650	0.244	0.813	77
2,4'-DDT	36.552	0.053	0.177	80
PCB 153	37.585	0.257	0.857	67
4,4'-DDT	39.138	0.053	0.177	97
PCB 138	39.589	0.214	0.713	71
PCB 187	41.233	0.226	0.753	70
PCB 128	41.617	0.182	0.607	78
PCB 156	43.771	0.177	0.590	71
PCB 180	45.432	0.178	0.593	66
PCB 170	47.668	0.155	0.517	68
PCB 208	51.919	0.185	0.617	44

Organochlorine contaminants in the anatolian water buffaloes' milk

Table 2. Residue levels of the OCPs and PCBs in the Anatolian water buffalo milk

Compound	PS	PS>MRL	Mean	Min	Max	MRLs ng/g (EU and Turkey)
alpha-HCH	50	5	6.34	2.07	25.17	10 (*)
beta-HCH	50	43	20.41	4.14	39.03	10 (*)
HCB	0	-	-	-	-	10 (*)
gamma-HCH	50	18	9.77	2.77	33.94	10 (*)
Aldrin	8	-	0.99	0.25	1.89	6 (1)
2,4'-DDE	2	-	2.49	1.89	3.10	-
4,4'-DDE	50	-	4.36	1.71	10.32	-
2,4'-DDT	4	-	1.37	0.09	2.26	-
4,4'-DDT	50	-	13.54	5.08	27.63	-
PCB 28	2	-	15.09	11.72	18.46	-
PCB 52	50	-	122.06	14.86	246.89	-
PCB 70	0	-	-	-	-	-
PCB 74	0	-	-	-	-	-
PCB 81	0	-	-	-	-	-
PCB 99	0	-	-	-	-	-
PCB 101	0	-	-	-	-	-
PCB 118	28	-	8.99	0.47	28.11	-
PCB 128	4	-	9.71	1.18	11.23	-
PCB 138	0	-	-	-	-	-
PCB 153	2	-	109.60	45.18	174.01	-
PCB 156	3	-	5.14	4.60	5.87	-
PCB 170	2	-	5.27	0.55	9.99	-
PCB 180	1	-	11.00	11.00	11.00	-
PCB 187	11	-	8.70	0.58	34.64	-
PCB 208	0	-	-	-	-	-
ΣDDTs	50	-	18.11	8.36	35.68	40
Σin-PCBs	50	48	127.27	14.86	355.09	40
ΣOCPs	50	-	54.77	23.21	105.33	-
ΣPCBs	50	-	135.56	30.72	362.95	-
ΣOCs	50	-	190.33	87.03	431.29	-

PS: Positive samples

(*) Indicates lower limit of analytical determination (EC, 2016, 2017; TFC, 2016)

(1) Aldrin and dieldrin combined expressed as dieldrin (EC, 2016; TFC, 2016)

Σin-PCBs: Sum of PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153 and PCB-180 (EC, 2011; TFC, 2011)

ΣDDTs: Sum of p,p'-DDT, o,p'-DDT, p-p'-DDE and p,p'-TDE (DDD) expressed as DDT (EC, 2016; TFC, 2016)

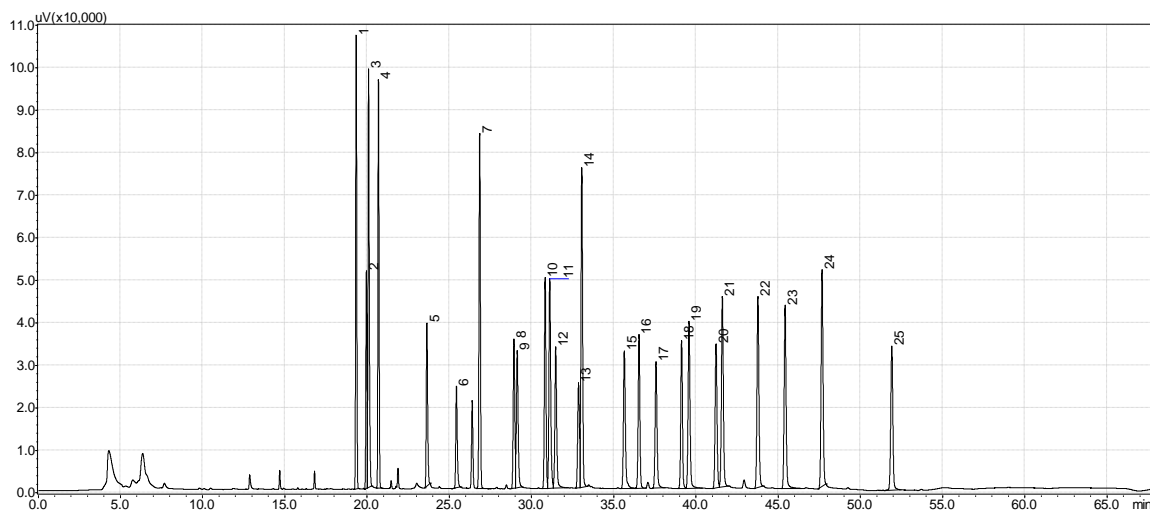


Figure 1. Mix standard chromatogram of the compounds at a concentration of 100 ng/g (alpha-HCH ¹, beta-HCH ², HCB ³, gamma-HCH ⁴, PCB 28 ⁵, PCB 52 ⁶, Aldrin ⁷, PCB 74 ⁸, PCB 70 ⁹, 2,4'-DDE ¹⁰, PCB 101 ¹¹, PCB 99 ¹², PCB 81 ¹³, 4,4'-DDE ¹⁴, PCB 118 ¹⁵, 2,4'-DDT ¹⁶, PCB 153 ¹⁷, 4,4'-DDT ¹⁸, PCB 138 ¹⁹, PCB 187 ²⁰, PCB 128 ²¹, PCB 156 ²², PCB 180 ²³, PCB 170 ²⁴, PCB 208 ²⁵)

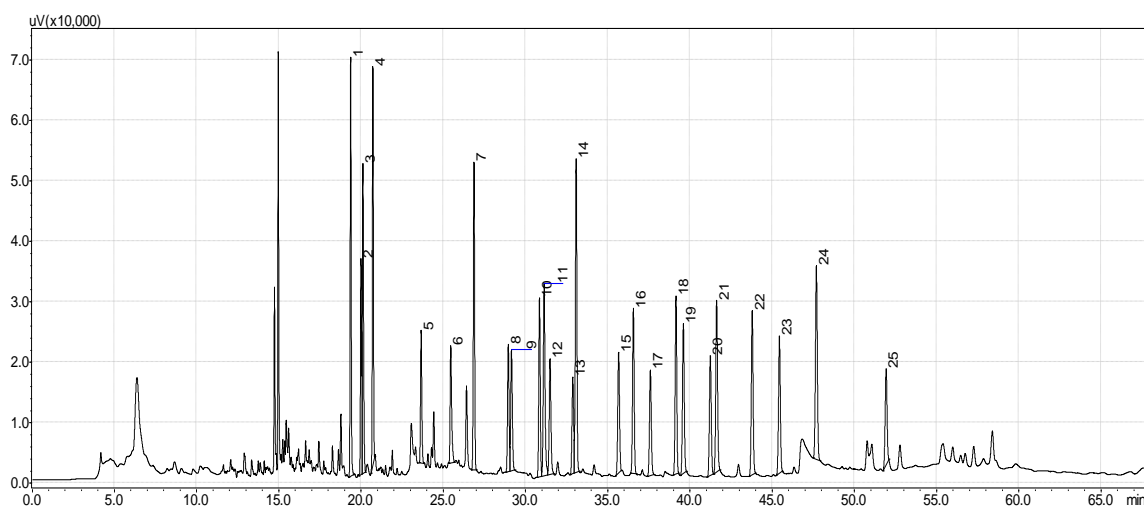


Figure 2. Mix spiked chromatogram of the compounds in buffalo milk fat at a concentration of 100 ng/g (alpha-HCH ¹, beta-HCH ², HCB ³, gamma-HCH ⁴, PCB 28 ⁵, PCB 52 ⁶, Aldrin ⁷, PCB 74 ⁸, PCB 70 ⁹, 2,4'-DDE ¹⁰, PCB 101 ¹¹, PCB 99 ¹², PCB 81 ¹³, 4,4'-DDE ¹⁴, PCB 118 ¹⁵, 2,4'-DDT ¹⁶, PCB 153 ¹⁷, 4,4'-DDT ¹⁸, PCB 138 ¹⁹, PCB 187 ²⁰, PCB 128 ²¹, PCB 156 ²², PCB 180 ²³, PCB 170 ²⁴, PCB 208 ²⁵)

In the present study, levels of certain OCPs and PCBs were examined in the water buffalo milk by using a validated analytical method. This work provides the first data on the contamination status of the milk of Anatolian water buffaloes by OCPs and PCBs, bred in the Kızılırmak Delta in

Samsun, Turkey. The results indicate that the Kızılırmak Delta is still being contaminated with some OCP and PCB compounds. The residual levels of Σ PCBs predominated, followed by Σ in-PCBs, Σ DDT's, beta-HCH, gamma-HCH, alpha-

HCH and Aldrin. PCB 52 was the dominant congener among the indicator PCBs, showing the highest incidence (100%) and concentration in the milk samples. PCB 70, PCB 74, PCB 81, PCB 99, PCB 101, PCB 138 and PCB 208 were not detected in any milk samples. With respect to organochlorine pesticides, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, alpha-HCH, beta-HCH and gamma-HCH were detected in all milk samples. HCB was not detected in any milk samples. The OCPs were detected in descending order of concentration as follows, beta-HCH > 4,4'-DDT > gamma-HCH > alpha-HCH > 4,4'-DDE > 2,4'-DDE > 2,4'-DDT > Aldrin. The frequencies of occurrence of the contaminated samples above MRLs were 96%, 86%, 36% and 10% for Σin-PCBs, beta-HCH, gamma-HCH and alpha-HCH, respectively. In contrast, there was no sample above MRLs contaminated with ΣDDTs and aldrin.

Although buffalo milk is the second most consumed milk worldwide (Pasquini et al., 2018), there have been limited reports on PCBs (Cirillo et al., 2008; Esposito et al., 2010; Santelli et al., 2006) and OCPs (Abbassy, 2017; Aslam et al., 2013; Barman and Mishra, 2015; Bulut et al., 2011; John et al., 2001; Makadiya and Pandey, 2017; Sajid et al., 2016; Shaker and Elsharkawy, 2015). However, comparing the results was not feasible as the researchers did not state the OC levels in water buffalo milk on fat weight basis except a small number of studies (Abbassy, 2017; Aslam et al., 2013; Bulut et al., 2011; Cirillo et al., 2008; Esposito et al., 2010).

Cirillo et al. (2008) investigated the presence and the levels of six non dioxin-like (NDL) PCBs (PCB 28, 52, 101, 138, 153 and 180) and one dioxin-like (DL)-PCB 118 in water buffalo milk and mozzarella cheese produced in Campania region, Italy. The mean concentration of ΣNDL-PCBs (indicator PCBs) was found as 13.53 ng/g fat weight with a minimum level of 3.40 ng/g fat and a maximum level of 43.00 ng/g fat. These amounts in the milk were 9 fold lower than in the present study as well as the distribution pattern of individual PCBs were different. The Toxic Equivalency Factor (TEF) methodology is used

to evaluate human health risks posed by DL compounds. The TEF value (Toxicity Equivalency Factor) of 0.00003 was attributed to PCB 118 by World Health Organisation (WHO) (Van den Berg et al., 2006). TEQ (Toxic Equivalency) value was found 0.270 pg TEQ/g fat which calculated considering the mean concentration of PCB 118 in the samples. This value was 8 to 9 times higher than that found by Cirillo et al. (2008).

It was reported that the North and Middle Basin areas of Kızılırmak River receive remarkably higher pollutant loads, due to domestic and industrial wastes which are discharged into the river without any treatment (Bakan et al., 2010). Gedik and İmamoğlu (2012) examined the occurrence and distribution of PCBs in surface sediments of the Kızılırmak River near a scrap yard in Kırıkkale province. ΣPCB amounts were detected up to 19.5 ng/g in sediments downstream of the yard and concentrations of individual PCB congeners were lower than 1 ng/g. One of the reason of PCBs pollution in the Kızılırmak Delta may be due to the drift followed by the distribution of these compounds to the catchment with the stream of the Kızılırmak River. In the present study, higher amounts of ΣPCBs (30.72 to 362.95 ng/g fat) were detected in the milk than in the sediments, probably due to the bioconcentration process of OC compounds in the animals (Shaker and Elsharkawy, 2015).

In Turkey, Bulut et al. (2011) investigated the contamination status of 50 milk samples of water buffaloes by OCPs from Afyonkarahisar region. They found beta-HCH levels above the MRL established in EC regulation and reported that the incidence were 64%, 16%, 8%, 6% and 2% for beta-HCH, 4,4'-DDT, Aldrin, gamma-HCH and delta-HCH, respectively. For alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, 4,4'-DDT and 4,4'-DDE the incidence were 100% in the milk samples and beta-HCH level exceeded the LODs stated in EC and TFC in the present study (EC, 2017; TFC, 2016). The water buffaloes in the Kızılırmak Delta stay in wetlands, lakes, marshes and swamps for resting and getting cool on the hot hours of the day (Selcuk, 2012). Therefore, they could have

been exposed to the organochlorine compounds much higher by dermal and/or oral routes. In another study, 100 raw cow milk samples collected from Samsun province were analysed for nine OC and five synthetic pyrethroid pesticides. They did not detect any pesticide residues in the cow milk samples (Güvenç and Aksoy, 2009).

The present results showed lower levels of OCPs in water buffalo milk than in the study conducted in Delhi City, India (Aslam et al., 2013). They reported that mean values were 48 ng/g fat, 137.60 ng/g fat, 164.05 ng/g fat and 156.77 ng/g fat for alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH and ΣDDTs, respectively. In another study conducted in Rosetta region Northern of Delta, Egypt, OC pesticide residue levels in buffalo milk were 2.0 ng/g fat, 1.58 ng/g fat, 1.70 ng/g fat, 2.09 ng/g fat and 1.29 ng/g fat for alpha-HCH, beta-HCH, gamma-HCH, 4,4'-DDE and 4,4'-DDT, respectively (Abbassy, 2017). These quantities in the water buffalo milk were lower than in the present study. It has been thought that various distribution patterns and concentrations of OC compounds in the milk of water buffaloes from different parts of the world may be related to pollution status of the environments, seasonal variations and some ethological characteristics of the water buffalo species.

CONCLUSION

It can be concluded from the present study that the OCPs, HCHs, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT and PCBs 52 and 118 were detected at high occurring frequencies in the milk samples of Anatolian water buffaloes bred in the Kızılırmak Delta in Samsun, Turkey. The mean values, except for aldrin and ΣDDTs, were above the maximum residue limit (MRLs) stated in the EC and TFC. Due to its fat rich content and high nutritional value, buffalo milk and milk products such as butter, yogurt, cream and cheese are consumed worldwide as well as in Samsun region. Hence, biomonitoring of hazardous chemical compounds in the water buffalo milk or milk products has a great importance for consumers health. In addition, further research is needed involving the pesticides which currently in usage

in agricultural purposes beside banned OCPs and PCBs, to protect both human and animal health.

REFERENCES

- Abbassy, M. M. S. (2017). Pesticide residues in buffalo and human breast milk of vegetables and fruits farming community at northern of delta in Egypt. *J Environ Anal Toxicol*, 07(02), 1-5.
- Aksoy, A., Das, Y. K., Yavuz, O., Guvenc, D., Atmaca, E., Agaoglu, S. (2011). Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyls levels in fish and mussel in Van region, Turkey. *Bull Environ Contam Toxicol*, 87(1), 65-69.
- Aslam, M., Rais, S., Alam, M. (2013). Quantification of organochlorine pesticide residues in the buffalo milk samples of Delhi City, India. *J Environ Prot*, 4(09), 964.
- Bakan, G., Özkoç, H. B., Tülek, S., Cüce1T, H. (2010). Integrated environmental quality assessment of the Kızılırmak River and its coastal environment. *Turk J Fish Aquat Sci*, 10(4).
- Barman, R. M., Mishra, B. K. (2015). Occurrence of organochlorine pesticide residues in buffalo milk of Dhanbad city, Jharkhand, India. *Int J Curr Res*, 7(8), 19189-19193.
- Bordet, F., Inthavong, D., Fremy, J.-M. (2002). Interlaboratory study of a multiresidue gas chromatographic method for determination of organochlorine and pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in milk, fish, eggs, and beef fat. *J AOAC Int*, 85(6), 1398-1409.
- Bulut, S., Akkaya, L., Gok, V., Konuk, M. (2011). Organochlorine pesticide (OCP) residues in cow's, buffalo's, and sheep's milk from Afyonkarahisar region, Turkey. *Environ Monit Assess*, 181(1-4), 555-562.
- Cirillo, T., Viscardi, V., Farina, A., Fasano, E., Del Prete, U., Cocchieri, R. A. (2008). Occurrence of polychlorobiphenyls in buffalo mozzarella cheese from Campania (Italy). *J Prev Med Hyg*, 49(4), 136-141.
- Colosio, C., Tiramani, M., Maroni, M. (2003). Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art. *Neurotoxicology*, 24(4-5), 577-591.

- EC. (2011). Regulation (EU) No 1259/2011 of 2 December 2011. Amending regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs. L 320 Official Journal of the European Union.
- EC. (2016). Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin.
- EC. (2017). Regulation (EU) 2017/978 of 9 June 2017.
- EFSA. (2018). National summary reports on pesticide residue analysis performed in 2016. *EFSA J, EN-1454*, 1-175.
- El-Shahawi, M. S., Hamza, A., Bashammakh, A. S., Al-Saggaf, W. T. (2010). An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta*, 80(5), 1587-1597.
- Esposito, M., Serpe, F. P., Neugebauer, F., Cavallo, S., Gallo, P., Colarusso, G., Baldi, L., Iovane, G., Serpe, L. (2010). Contamination levels and congener distribution of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in buffalo's milk from Caserta province (Italy). *Chemosphere*, 79(3), 341-348.
- Gedik, K., İmamoğlu, İ. (2012). Chemical mass balance (CMB) evaluation of polychlorinated biphenyl (PCB) sources in sediments of Kızılırmak River, Turkey, near a ccrap yard. *Environ Forensics*, 13(1), 39-44.
- Güvenç, D., Aksoy, A. (2009). Investigation of some pesticide residues in raw milk samples collected from Samsun province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(2), 281-286.
- Hong, S. H., Yim, U. H., Shim, W. J., Oh, J. R., Lee, I. S. (2003). Horizontal and vertical distribution of PCBs and chlorinated pesticides in sediments from Masan Bay, Korea. *Mar Pollut Bull*, 46(2), 244-253.
- John, P. J., Bakore, N., Bhatnagar, P. (2001). Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India. *Environ Int*, 26(4), 231-236.
- Makadiya, J., Pandey, A. (2017). Detection of pesticides in buffalo milk collected from different areas of Gandhinagar and Ahmedabad by thin layer chromatography. *Int J Chemtech Res*, 10(1), 231-238.
- Medrado-Faria, M. D., de Almeida, J. W., Zanetta, D. M., Gattas, G. J. (2000). Nervous system cancer mortality in an industrialized area of Brazil 1980-1993. *Arq Neuropsiquiatr*, 58(2b), 412-417.
- Ménard, O., Ahmad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., Lopez, C. (2010). Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chem*, 120(2), 544-551.
- Mrema, E. J., Rubino, F. M., Brambilla, G., Moretto, A., Tsatsakis, A. M., Colosio, C. (2013). Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity. *Toxicology*, 307, 74-88.
- Muscat, J. E., Britton, J. A., Djordjevic, M. V., Citron, M. L., Kemeny, M., Busch-Devereaux, E., Pittman, B., Stellman, S. D. (2003). Adipose concentrations of organochlorine compounds and breast cancer recurrence in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12(12), 1474-1478.
- Pasquini, M., Osimani, A., Tavoletti, S., Moreno, I., Clementi, F., Trombetta, M. F. (2018). Trends in the quality and hygiene parameters of bulk Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*) milk: A three year study. *Anim Sci J*, 89(1), 176-185.
- Porpora, M. G., Medda, E., Abballe, A., Bolli, S., De Angelis, I., di Domenico, A., Ferro, A., Ingelido, A. M., Maggi, A., Panici, P. B., De Felip, E. (2009). Endometriosis and organochlorinated environmental pollutants: a case-control study on Italian women of reproductive age. *Environ Health Perspect*, 117(7), 1070-1075.
- Sajid, M. W., Shamoan, M., Randhawa, M. A., Asim, M., Chaudhry, A. S. (2016). The impact of seasonal variation on organochlorine pesticide

- residues in buffalo and cow milk of selected dairy farms from Faisalabad region. *Environ Monit Assess*, 188(10).
- Santelli, F., Boscaino, F., Cautela, D., Castaldo, D., Malorni, A. (2006). Determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzo-p-furans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in buffalo milk and mozzarella cheese. *Eur Food Res Technol*, 223(1), 51-56.
- Schettgen, T., Alt, A., Esser, A., Kraus, T. (2015). Current data on the background burden to the persistent organochlorine pollutants HCB, p, p'-DDE as well as PCB 138, PCB 153 and PCB 180 in plasma of the general population in Germany. *Int J Hyg Environ Health*, 218(4), 380-385.
- Selcuk, Z. (2012). The Kızılırmak Delta: the natural habitat of Anatolian Water Buffaloes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18(1), 167-168.
- Shaker, E. M., Elsharkawy, E. E. (2015). Organochlorine and organophosphorus pesticide residues in raw buffalo milk from agroindustrial areas in Assiut, Egypt. *Environ Toxicol Pharmacol*, 39(1), 433-440.
- StockholmConvention. (2001). The Stockholm Convention on persistent organic pollutants Retrieved from <http://chm.pops.int/>
- TheConvention/Overview/tabid/3351/Default.aspx
- TFC. (2011). Turkish Food Codex, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. 28157 Resmi Gazete.
- TFC. (2016). Turkish Food Codex, Türk Gıda Kodeksi Pestisitlerin Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği. 29899 Resmi Gazete.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C.,
- Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci*, 93(2), 223-241.
- Yilmaz, A., Ocak, E., Kose, S. (2017). A research on milk yield, milk composition and body weights of Anatolian buffaloes. *Indian J Anim Res*, 51(3), 564-569.



**DOĞAL RENK MADDESİ KATKILI SERT ŞEKERLEME ÜRETİMİ: FARKLI
KARBONHİDRAT FORMÜLASYONLARININ RENK, CAMSI GEÇİŞ, HİGROSKOPİTE,
KARBONHİDRAT KOMPOZİSYONU VE DUYUSAL ÖZELLİKLER ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Fatih Mehmet Yılmaz*, Ebru Yıldırım, Merve Karakuş

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Efeler, Aydın, Türkiye.

Geliş / *Received*: 05.12.2018; Kabul / *Accepted*: 17.03.2019; Online baskı / *Published online*: 01.04.2019

Yılmaz, F.M., Yıldırım, E., Karakuş, M. (2019). Doğal renk maddesi katkılı sert şekerleme üretimi: Farklı karbonhidrat formülasyonlarının renk, camsı geçiş, higroskopite, karbonhidrat kompozisyonu ve duyu özellikleri üzerine etkileri. *GIDA* (2019) 44 (2): 357-368 doi: 10.15237/gida.GD18117

Yılmaz, F.M., Yıldırım, E., Karakuş, M. (2019). Production of natural colorant fortified hard candy: Effects of different carbohydrate formulations on colour, glass transition, hygroscopicity, carbohydrate composition and sensory properties. *GIDA* (2019) 44 (2): 357-368 doi: 10.15237/gida.GD18117

ÖZ

Bu çalışmanın amacı sakaroz, sorbitol ve glikozun yer aldığı üç farklı karbonhidrat formülasyonu kullanarak renklendirilmiş sert şeker üretmektir. Bu kapsamda, siyah havuç konsantresi (SHK) katkı ve katkısız olarak altı farklı sert şeker %100 sakaroz, %76 sakaroz + %24 sorbitol, %76 sakaroz + %24 glikoz olarak formüle edilerek üretilmiş ve bu ürünlerin renk, karbonhidrat kompozisyonu, camsı geçiş, higroskopite ile duyu özellikleri değerlendirilmiştir. En yüksek higroskopite değerlerinin sorbitolün yer aldığı formülasyonlara ait olduğu tespit edilmiş ve SHK kullanımı tüm formülasyonlarda SHK katkısızlara kıyasla sert şekerlerin higroskopitelerinin önemli ölçüde azalmasını sağlamıştır ($P < 0.05$). Duyusal analiz sonuçlarına göre, SHK katkı ve katkısız en çok beğenilen ürünün glikozun yer aldığı formülasyonlar olduğu belirlenmiş, bunu sorbitol takip etmiştir. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analiz sonuçlarının, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile karbonhidrat kompozisyonu, duyu analiz ve higroskopite analizi sonuçlarıyla ilişkilendirilebilir nitelikte olduğu görülmüştür. **Anahtar kelimeler:** Sert şeker, doğal renk maddesi, higroskopite, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), formülasyon.

**PRODUCTION OF NATURAL COLORANT FORTIFIED HARD CANDY: EFFECTS OF
DIFFERENT CARBOHYDRATE FORMULATIONS ON COLOUR, GLASS
TRANSITION, HYGROSCOPICITY, CARBOHYDRATE COMPOSITION AND
SENSORY PROPERTIES**

ABSTRACT

The objective of this study was to produce coloured hard candies using three different formulations of carbohydrates which are sucrose, sorbitol and glucose. In this context, six different hard candies formulated by 100% sucrose, 76% sucrose + 24% sorbitol, 76% sucrose + 24% glucose were produced with or without addition of black carrot concentrate (BCC) and evaluated in terms of colour, carbohydrate composition, glass transition, hygroscopicity and sensory properties. The highest hygroscopicity values were determined in sorbitol included formulations and the use of BCC led to decrease hygroscopicities compared to BCC not-included hard candies in all formulations ($P < 0.05$). The most preferred candies were glucose included formulations followed by sorbitol included ones regardless of BCC inclusion according to sensory analysis. Differential scanning calorimetry (DSC) analysis revealed comparable results among the results of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of carbohydrates, sensory analysis and hygroscopicity analysis.

Keywords: Hard candy, natural colorant, hygroscopicity, differential scanning calorimetry (DSC), formulation.

*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ fatih.yilmaz@adu.edu.tr,

☎ (+90) 256 213 7503

☎ (+90) 256 213 6686

GİRİŞ

Şekerin günümüzde endüstriyel olarak yoğun şekilde üretilmesi ve gelişen teknoloji ile beraber ticaretinde ve tüketiminde meydana gelen artışlar şekerleme üretimine yansımış ve bu sektörün de gelişmesine olanak sağlamıştır (Elgün, 2013; Kuşat ve Kösekaşyaoğlu, 2011). Şeker tüketimi gelişmiş ülkelerde kişi başına yıllık yaklaşık 7 kg iken az gelişmiş veya gelişmekte olan ülkelerde tüketimin bu rakamın çok altında olduğu tahmin edilmekte; ancak her geçen yıl arttığı da bildirilmektedir (Mutlu vd., 2018).

Şekerleme ve çikolatalı mamullerin dünyada toplam üretiminin yıllık yaklaşık 11.2 milyon ton olduğu ve toplam üretimin yaklaşık %45'lik önemli payını belli başlı çokuluslu büyük firmaların üstlendiği ve piyasada söz sahibi olduğu bildirilmektedir (İlaslan, 2014; Anonim, 2017). Türkiye'de ise 1924 yılında bisküvi üretimi ile başlayan bisküvi, çikolata ve şekerli mamuller sektörü günümüzde modern teknoloji ile donatılmış 40'ı aşkın fabrika ile faaliyet göstererek yıllık yaklaşık 1.7 milyon ton üretim kapasitesine sahiptir (Önder, 2016). Anadolu'da şekerleme üretiminin ve şekerleme tarihinin 14 - 15. yüzyıla kadar uzandığı tahmin edilmektedir. Nitekim Osmanlı Devletinin henüz ilk dönemlerinde dahi meyvelerin tatlı ve şekerleme yapımında değerlendirildiği belirtilmektedir (Özlü, 2011). Osmanlı'dan günümüze ulaşan ve günümüzde de önemli yeri bulunan şekerleme, genelde Orta Doğu'nun özelde ise Türkiye'nin önemli geleneksel ürünleri arasında yer almaktadır (Güvemli, 2018).

Şekerleme ürünlerinin tüketici tercihinin göre geliştirilmiş birçok çeşidi bulunmaktadır (Karagül, 2012). Bunlar; akide ve mevlana gibi sert şekerlemeler, jöle ve karamel gibi yumuşak şekerlemeler, dolgulu & kaplamalı gibi karışık şekerlemeler ve ayrıca helva, çiklet, lokum, çikolata gibi şekerleme ürünleridir (Elgün, 2013). Şekerleme üretiminde ürünün kalitesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Formülasyon, işlem sıcaklığı & süresi ve son ürün nem içeriği en önemli faktörler olarak bilinmektedir. Şekerleme çeşitlerinden biri olan sert şekerler; katı, parlak, aşırı soğutulmuş, camsı özellikte ve kristal

olmayan süper doymuş şeker çözeltileridir (Cardoso ve Abreu, 2004; Demir vd., 2010). Sert şekerlerin formülasyonunda sakaroz, glikoz, früktoz, sorbitol ve maltoz yer alabilmektedir. Açık veya vakum kazanlarında pişirme aşamasının sonlarına doğru inversiyon sağlanması amacıyla sitrik, malik, laktik asit gibi organik asit ilave edilir ve tercihen aroma ilave edilerek yoğurma, katlama, şekil verme ve soğutma uygulanarak ürün elde edilir (Ergun vd., 2010).

Sert şekerlerin nem içeriği genellikle %5'in altındadır. Sert şeker gibi düşük nem içeriğine sahip olan ürünlerde şekerler camsı - amorf yapıda bulunmaktadır. Şekerin camsı geçiş formunda bulunması, ürünün şeffaf ve net bir görünümde olmasını ayrıca sert ve kırılabilir yapıya sahip olmasını sağlamaktadır. Camsı geçiş sıcaklığı (T_g)'nın altında depolanan sert şeker, depolama esnasında uzun süre stabil kalabilmekte; ancak depolama sıcaklığı T_g'nin üzerinde olursa şeker camsı yapısını kaybedip yapışkan bir form almakta ve bu durum ürünün fiziksel, kimyasal ve duyuşal kalitesini olumsuz etkilemektedir (Tan ve Kerr, 2017; Netramai vd., 2017). Bunun yanında, sert şekerler formülasyona bağlı olarak yüksek ya da düşük higroskopik özellik gösterebilmektedir. Buldukları ortamdaki havadan hızla nem kazanabilmektedirler. Bu durumda şekerlerin camsı geçiş özellikleri değişebilmekte bunun sonucunda da yapısal ve duyuşal özelliklerinde istenmeyen farklılıklar gözlenebilmektedir (Smidova vd., 2003; Altan, 2001).

Sert şeker ürünlerinde bir diğer kalite parametresi ise renktir (Smidova vd., 2003). Bir gıda ürününün rengi son ürün kalitesini etkilemesi ve tüketicide oluşturacağı beklentileri karşılaması açısından oldukça önemlidir (Zellner vd., 2018). Son yıllarda, tüketicilerin gıdalarda kullanılan sentetik renklendiricilerin güvenilirliği hakkındaki kaygılarının yanında yasal düzenlemeler nedeniyle de yaygın olarak kullanılan sentetik boyalara alternatif olabilecek doğal pigmentlerin kullanımında artış görülmektedir (Koç vd., 2012; Gutiérrez-Zúñiga vd., 2014). Doğal renk maddelerinin üründe istenilen rengin sağlanmasının yanı sıra biyoaktif özellikleri ile serbest radikallerin neden olduğu sağlık problemlerini engelleyici

etkileri olduğu da bilinmektedir (Hepsağ vd., 2012). Doğal pigmentlerin gıdalarda kullanımı açısından siyah (mor) havuç (*Daucus carota* L ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef) antosiyaninleri, diğer bitkisel kaynaklara kıyasla daha yüksek miktarda antosiyanin içermesi ve antosiyaninlerinin açillenmiş olmasından ötürü sıcaklık ve pH değişimlerine karşı daha stabil olması nedeniyle gıda endüstrisinde tercih edilen doğal renk maddesidir (Yılmaz ve Bilek, 2018).

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmanın amacı; sakaroz, glikoz, sorbitol ve siyah havuç konsantresinin yer aldığı farklı formülasyonlarla geleneksel ürünümüz olan sert şeker üretmek ve üretilen şekerlerin renk, camsı geçiş, karbonhidrat kompozisyonu, higroskopite ve duyuşal özellikleri açısından karşılaştırılması ve değerlendirilmesi olarak belirlenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal ve Kimyasallar

Üretimde kullanılan sakaroz Balküpe Keskinlik Gıda (Aksaray)'dan, glikoz şurubu (72 °Bx), sorbitol (70 °Bx), sitrik asit ve çilek aroması Smart Kimya Ltd. (İzmir)'den; siyah havuç konsantresi (63.25 °Bx) Erkon Konsantre A.Ş. (Ereğli, Konya)'den temin edilmiştir. Sakaroz, D-(+)-glikoz, D-(-)-früktoz, D-sorbitol standartları Sigma (St. Louis, Mo, ABD)'dan; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) saflıkta su ise Merck (Darmstadt, Almanya)'den temin edilmiştir. Diğer kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

Yöntem

Bu çalışmada altı farklı formülasyon ile geleneksel açık kazan üretim yöntemi kullanılarak sert şeker üretimi gerçekleştirilmiştir. Karbonhidrat kompozisyonu bakımından üç farklı formülasyon kuru madde üzerinden %100 sakaroz (I), %76 sakaroz + %24 sorbitol (II) ve %76 sakaroz + %24 glikoz (III) olarak kullanılmıştır. Bu formülasyonlarda siyah havuç konsantresinin (SHK) yer aldığı ve yer almadığı üretimler yapılarak toplam altı farklı sert şeker üretimi gerçekleştirilmiştir. Tüm üretimlerde sitrik asit miktarı, su miktarı, aroma miktarı, ısıtma sıcaklığı & süresi, kazandan alma sıcaklığı & zamanı gibi

parametreler sabit tutulmuştur. Deneme planına göre belirlenen şeker tartımları pişirme kazanına alınmış, şeker ağırlığının %11.25'i kadar su eklenmiş ve ısıtma başlatılmıştır. Pişirme süresince kazan içi karışım sıcaklığı data logger (Testo 176 T4) ile takip edilmiştir. Tam olarak erime 110 ± 2 °C'de gerçekleşmiş ve karışım sıcaklığı 140 °C'ye ulaştığında şeker tartımının %0.04'ü kadar %30'luk (w/v) sitrik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Üretimler esnasında suda çözünür kuru madde miktarı, ölçüm aralığı 0 – 95 °Bx olan dijital refraktometre (SOIF DBR95, Çin) kullanılarak, deiyonize su ile seyreltme yapılarak 25 ± 2 °C'de ölçülmüştür. Sıcaklık 170 °C'ye ulaştığında 96 ± 1 °Bx'e ulaşılmış, kaynatma işlemine son verilmiş ve SHK (renkli üretim olan formülasyonlar için) ile çilek aroması sırasıyla şeker tartımının %0.25'i ve %0.01'i (w/w) kadar ilave edilmiştir. Sıcaklık 150 °C'ye düştüğünde karışım soğuk mermer üzerine dökülerek soğutma aşamasına geçilmiş ve katlama tekniği ile 85 °C'ye soğutulmuştur. Daha sonra, bu sıcaklıktaki şeker hamuru 12 x 12 mm'lik şeker kalıplarına aktararak 24 – 25 °C'ye soğutulmuştur. Son olarak kalıplardan çıkarılan sert şekerler cam kavanozlarda karanlık ve nemsiz ortamda analizlere dek bekletilmiştir.

Analizler

Renk Analizi

Şeker örneklerinin L^* , a^* ve b^* renk değerleri renk ölçüm cihazı (Konica Minolta, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler ile C^* (chroma, renk yoğunluğu) ve h° (hue, renk tonu) sırasıyla Eşitlik 1 ve 2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (1)$$

$$h^\circ = \arctan(b^*/a^*) \quad (2)$$

HPLC ile Karbonhidrat Kompozisyonu Analizi

Şeker bileşiminin belirlenmesinde 10 g şeker örnekleri havan ile öğütülmüş, behere aktarılmış ve üzerine 30 ml %25 EtOH çözeltisi ilave edilerek ultratüraks ile 6000 rpm'de 2 dakika parçalanmıştır. Karışım daha sonra 50 ml'lik balon jöjeye aktarılmış ve %25 EtOH çözeltisi ile hacim çizgisine tamamlandıktan sonra 0.45 µm'lik filtreden (Sartorius RC, Goettingen, Almanya)

geçirilmiştir. Örnekler ve hazırlanan standartlar HPLC'ye (Shimadzu Prominence LC-20A) enjekte edilmiştir. Aminex HPX-87P karbonhidrat kolonu (300 x 7.8 mm; 80 °C) ve refraktif indeks dedektör (RID)'ün kullanıldığı çalışmada HPLC saflıkta su mobil fazının akış hızı 0.6 ml/dk. olarak belirlenmiştir (Rupérez ve Toledano, 2003).

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Şeker örnekleri ezilerek toz haline getirilmiş ve DSC cihazına yüklemek üzere alüminyum numune kaplarına 0.06 g toz örnekler yerleştirilmiştir. Analiz sıcaklığı - 40 °C'den 120 °C'ye 10 °C/dk. yükselecek şekilde ayarlanmıştır. Analiz sonunda elde edilen grafiklerden camsı geçiş sıcaklıkları (T_g), erime sıcaklıkları (T_m) ve entalpi değerleri (ΔH) belirlenmiştir (Smidova vd., 2003).

Higroskopite Analizi

Analiz için, 16 litre hacimli desikatör içinde %75.3 bağıl nem (RH) sağlamak amacıyla 200 g NaCl/60 g su (1 L hacim için) hazırlanmış ve gerekli rutubetli ortam sağlanmıştır. Desikatör içine delikli tartım kapları ile analiz edilecek örneklerden 40 ± 1 g bırakılmış ve toplam 48 saat süre boyunca ($22 + 2$ °C) belirli aralıklarla ağırlık değişimi kaydedilmiştir. Örneklerin higroskopite (nem kazanma) değerleri Eşitlik 3 ile hesaplanmıştır (Netramai vd., 2018).

$$\text{Higroskopite} = \frac{[(\text{Son tartım} - \text{ilk tartım}) / \text{İlk tartım}] \times 100}{(3)}$$

Duyusal Analiz

Üç farklı şeker formülasyonu ve toplam altı çeşit üretilmiş olan sert şekerler 27 – 47 yaş aralığındaki Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi/Elemenlerinden oluşan 16 panelist ile duyu analize tabi tutulmuştur. Duyusal analiz öncesi panelistler ile bir eğitim toplantısı yapılmıştır. Her bir paneliste, her ürün grubundan sert şeker örnekleri rastgele üç basamaklı bir sayı ile numaralandırılarak sunulmuş ve puanlamalarını hazırlanan değerlendirme formunda yapmaları istenmiştir. Duyusal analizde panelistlerden ürünleri 'görünüş', 'yapı', 'lezzet' ve

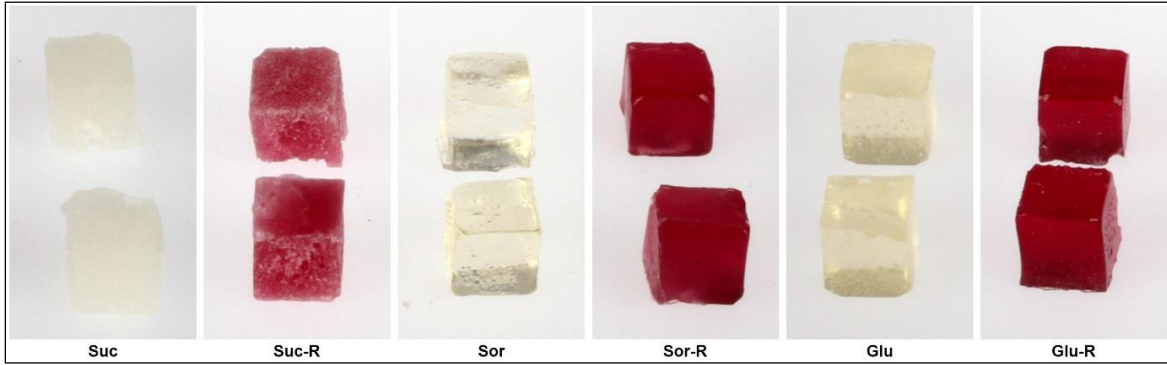
'genel beğeni' olmak üzere dört farklı açıdan 1 – 5 puan skalasında (1: Çok kötü, 2: Kötü, 3: Fena değil, 4: İyi, 5: Çok iyi) değerlendirmeleri istenmiştir (Lawless and Heymann, 2010).

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS paket programı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ile yapılmıştır. Elde edilen verilerde, sonuçlar üzerine parametrelerin etkisi varyans analizi ile tespit edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar ($P < 0.05$) Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Sert şeker grubunda yer alan akide şekerinin doğal renk maddesi katkısıyla üretimini amaçlandığı bu çalışma kapsamında öncelikle duyu olarak kabul edilebilir ürünü elde etmek için en uygun formülasyonlar ve işlem parametreleri belirlenmiştir. Sert şekerlerde önemli kalite problemleri olan karamelizasyon, ağızda yapışma ve soğuk erime göz önünde bulundurularak tüketici tarafından kabul edilebilirliği ön denemeler ile ilk olarak ele alınmıştır. Bu kapsamda karbonhidratların farklı oranlarda kullanıldığı seri üretimler gerçekleştirilmiş; aynı zamanda formülasyonda yer alan girdilerin hangi aşamalarda eklenmesi gerektiğine ve pişirme aşamasında sıcaklık & süre parametrelerine karar verilmiştir (Ön denemelere ait sonuçlar verilmemiştir). Ön denemelerde gerçekleştirilen üretimlerde hammaddelerin farklı girdileri ıslak ağırlık olarak ele alınmasına rağmen asıl üretimlerin formülasyonları karbonhidratların kuru madde üzerinden ağırlığı hesaplanarak sunulmuştur. Sonuç olarak, üç farklı karbonhidrat formülasyonunun yer aldığı denemeler ile doğal renk maddesi katkılı ve katkısız akide şekerleri şu şekilde üretilmiştir: I: %100 sakaroz (Suc), II: Renklendirilmiş %100 sakaroz (Suc – R), III: %76 sakaroz + %24 sorbitol (Sor), IV: Renklendirilmiş %76 sakaroz + %24 sorbitol (Sor – R), V: %76 sakaroz + %24 glikoz (Glu), VI: Renklendirilmiş %76 sakaroz + %24 glikoz (Glu – R). Üretilen sert şekerlere ait görseller Şekil 1'de sunulmuştur.



Şekil 1. Altı farklı formülasyon ile üretilmiş sert şekerler (Suc: %100 sakaroz; Sor: %76 sakaroz + %24 sorbitol; Glu: %76 sakaroz + %24 glikoz; R: Siyah havuç konsantresi katkıli renkli şeker).

Figure 1. Hard candies produced with six different formulations (Suc: 100% sucrose; Sor: 76% sucrose + 24% sorbitol; Glu: 76% sucrose + 24% glucose; R: Black carrot concentrate added colored hard candy).

Sert şeker üretiminde sık karşılaşılan durumlar olan 'soğuk erime', 'ağızda yapışma' ve 'kristalizasyon' problemleri bu çalışmanın ön denemelerinde de gözlenmiş ve en belirgin sebeplerden birinin inversiyon amacıyla kullanılan sitrik asit miktarı ve eklenme aşaması olduğu anlaşılmıştır. Sitrik asit miktarının formülasyonda fazla olması ağızda yapışma ve soğuk erimeye; yetersiz olması ise kristalizasyona neden olmuştur. Söz konusu durumlar göz önünde bulundurulduğunda şeker tartımının %0.04'ü kadar %30'luk (w/v) sitrik asit çözeltisinin pişirme sıcaklığı 140 °C'ye ulaştığında ilave edilmesinin en uygun çözüm olduğu yazarlar tarafından belirlenmiştir.

Sert Şekerlerin Renk Değerleri

Bir gıdanın rengi, ürünün tercih edilişliği etkileyen önemli bir kriterdir ve ürün geliştirmelerde renk değerlerinin ölçümü bu açıdan önemlidir (Sukkwai vd., 2018). Altı farklı formülasyon ile üretilmiş renk maddesi katkıli ve katkısız akide şekerlerin renk ölçüm sonuçları Çizelge 1'de gösterilmiştir. Koyuluk – aydınlık ifadesi olan L* değeri bakımından en yüksek değer SHK katkısız Suc örneğine ait olduğu; buna karşın en düşük değerin ise Sor-R'ye ait olduğu belirlenmiştir. Kolorimetrede a* yani kırmızılık – yeşillik bakımından pozitif en yüksek değere sahip olan ürünün Glu-R olduğu bulgulanmıştır. Bunu Suc-R ve Sor-R takip etmiştir. Sarı rengin belirgin olarak gözlemlendiği SHK katkısız Glu kodlu numunelerin en yüksek b* değerine sahip olduğu

bulgulanmıştır. Üretiminde pH değerinin 4.5 olarak ayarlanıp 1 kg şeker hamuruna 2.6 g SHK katkısıyla akide şekerinin üretildiği çalışma (Koç vd., 2012) ile karşılaştırıldığında a* değerlerinin bu çalışmada tespit edilen değerler ile kıyaslanabilir olduğu (12.8); ancak renk yoğunluğu (C*) ve renk tonu (h°) açısından her iki çalışmada farklı değerlerin elde edildiği anlaşılmaktadır. Bu çalışma kapsamında formülasyonda yer alan farklı karbonhidrat kompozisyonlarının SHK katkıli ve katkısız sert şekerlerde renk yoğunluğu değerlerini etkilediği sonucuna ulaşılmaktadır. Bu etkinin farklı karbonhidratların yüksek sıcaklıkta enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarında esmer renk oluşum derecelerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir (Wongwivat ve Wattanachant, 2014).

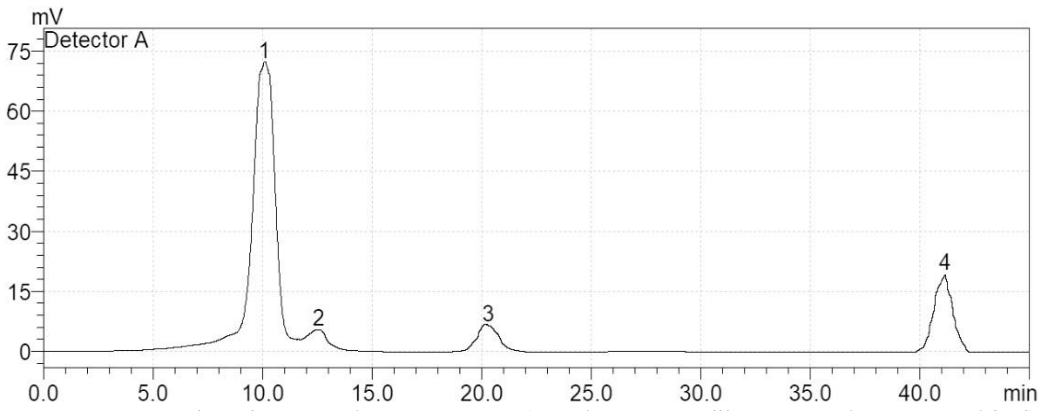
Sert Şekerlerin Karbonhidrat Kompozisyonu

Formülasyonda yer alan üç farklı karbonhidrat kombinasyonu (sakaroz, sakaroz + sorbitol, sakaroz + glikoz) ile üretilen akide şekerlerinin HPLC ile karbonhidrat kompozisyonu analizi gerçekleştirilmiştir. Üretimde sıcaklığın ve asidin inversiyonu ne ölçüde etkilediği bu analiz ile incelenmiştir. Akide şekerlerinin RID dedektör kullanılarak HPLC ile analizinde kromatogramda sırasıyla sakaroz, glikoz, früktoz ve sorbitol tespit edilmiş ve bu maddelerin alıkonma süreleri sırasıyla 10.1, 12.2, 19.7 ve 40.5 dk. olmuştur. Analize ait örnek bir HPLC kromatogramı Şekil 2'de sunulmuştur.

Çizelge 1. Farklı formülasyonlarla üretilmiş sert şekerlerin renk değerleri.
Table 1. Colour values of hard candies produced with different formulations.

Örnek Sample	L*	a*	b*	C*	h°
Suc	36.53 ± 1.37 ^a	-2.33 ± 1.15 ^a	3.59 ± 1.18 ^a	4.31 ± 1.51 ^a	-57.54 ± 8.33 ^a
Suc-R	29.35 ± 1.52 ^b	6.85 ± 1.98 ^b	2.55 ± 0.88 ^{a, b}	7.33 ± 2.08 ^{a, b}	20.57 ± 4.73 ^b
Sor	31.08 ± 1.03 ^b	-8.49 ± 1.61 ^c	0.94 ± 0.69 ^b	8.55 ± 1.63 ^{b, c}	-6.33 ± 4.20 ^c
Sor-R	9.56 ± 5.48 ^c	5.62 ± 1.02 ^b	-1.81 ± 1.17 ^c	5.96 ± 1.24 ^{a, b}	-17.29 ± 8.65 ^c
Glu	22.71 ± 1.49 ^d	-3.33 ± 1.92 ^a	4.75 ± 1.61 ^d	6.18 ± 0.55 ^{a, b}	-54.02 ± 22.58 ^a
Glu-R	10.77 ± 0.40 ^c	10.60 ± 3.53 ^d	3.37 ± 0.79 ^a	11.13 ± 3.57 ^c	18.15 ± 3.57 ^b

Aynı sütünde yer alan farklı harfler istatistikî farklılıkları simgelemektedir ($P < 0.05$).
Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)



Şekil 2. 'Sor' numunesine ait HPLC kromatogramı (1: Sakaroz, 2: Glikoz, 3: Früktoz, 4: Sorbitol).
Figure 2. HPLC chromatogram of 'Sor' sample (1: Sucrose, 2: Glucose, 3: Fructose, 4: Sorbitol).

Üretimlerde früktoz kullanılmamasına karşın formülasyonlarda sorbitolün ve glikozun yer aldığı şeker numunelerinde inversiyon sonucu olarak früktoz da tespit edilmiştir (Çizelge 2). Sıcaklığın ve ortamda asidin varlığının kombine etkisiyle sakaroz inversiyona uğramakta ve bunun sonucunda glikoz ve früktoz oluşmaktadır (Finley vd., 2018). Sonuçlar incelendiğinde, inversiyona bağlı glikoz oluşumunun früktoza kıyasla nispeten daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Bu durum glikoz ve früktozun yüksek sıcaklıkta asit varlığında sakarozdan inversiyon sonucu oluşum hızlarındaki farklılık ile açıklanabilir (Schnepel ve Hoffmann, 2014). Bunun haricinde, sakarozun %100 olarak yer aldığı formülasyonlarda früktozun hiç tespit edilemediği; ancak sorbitol ve glikozun bulunduğu formülasyonlarda glikozun haricinde früktozun da oluştuğu ve miktarının tespit edildiği bulgulanmıştır. Bu durum, ortamda invert şeker varlığının inversiyon hızını artırması olarak yorumlanabilir (Nelson ve Theodore,

1924). Sorbitolün yer aldığı formülasyonlarda glikoz miktarının yalnızca sakaroz kullanılarak üretilen şekerlerdeki glikoz miktarından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ticari sorbitol endüstriyel olarak glikozdan üretilmektedir (Wisnlak ve Simon, 1979) ve işlemlerin etkisiyle yapıtaşını oluşturan glikoza belli ölçüde parçalandığı yorumu da yapılabilir.

DSC Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sert şekerlerin DSC analizi sonucunda elde edilen camısı geçiş sıcaklığı (T_g), erime sıcaklığı (T_m) ve entalpi (ΔH) değerleri Çizelge 3'te sunulmuştur. Sert şeker üretim esnasında yüksek sıcaklıklarda pişirme ve ardından soğutma işlemi, karbonhidrat kompozisyonlarının camısı geçiş özelliklerinde önemli değişiklikler oluşturabilmektedir. Camısı geçiş özelliği, gıda içerisinde moleküler hareketleri etkileyen bir özelliktir. Sert şeker gibi düşük nem içeriğine sahip gıdaların camısı geçiş özelliklerinin doğrudan yapısal özellikler ile ilişkilendirildiği

bildirilmektedir. Yanı sıra, camsı geçiş özelliklerinin düşük nem içeriğine sahip yüksek karbonhidrat kompozisyonlu gıdaların yapısı, mikro-yapısı, kristalizasyon ve difüzyon olayları ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmektedir. Çizelge 3 incelendiğinde, en yüksek T_g değerlerinin sukrozun %100 olarak yer aldığı formülasyonlara ait olduğu (42.05 ve 44.16 °C), bunu sırasıyla glikozun (38.81 ve 36.39 °C) ve sorbitolun (19.24 ve 19.06 °C) takip ettiği görülmektedir. Sakaroz glikoz ya da früktoz ilavesinin camsı geçiş sıcaklığını ve erime entalpisini düşürdüğü rapor edilmiştir (Wang vd., 2019). Bu çalışmada da

benzer şekilde formülasyonda sakaroz glikoz ve sorbitol ilavesinin T_g'yi düşürdüğü görülmektedir. Üç farklı karbonhidrat kompozisyonu ile üretilmiş sert şekerlerin DSC termogramları Şekil 3'de verilmiştir. Sorbitole ait DSC eğrilerinden T_m ve ΔH değerleri hesaplanamamıştır. Buna karşın, glikozun yer aldığı formülasyonların %100 sakarozla kıyasla çok daha yüksek entalpi değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Entalpi değerlerinin üretilen sert şekerlerin ağızda erime özellikleri ile doğrudan ilişkilendirilebileceği yorumu yapılabilir.

Çizelge 2. Sert şekerlerin karbonhidrat kompozisyonu.

Table 2. Carbohydrate composition of hard candies.

Örnek	Sakaroz (g/100 g)	Glikoz (g/100 g)	Früktoz (g/100 g)	Sorbitol (g/100 g)
Sample	Sucrose (g/100 g)	Glucose (g/100 g)	Fructose (g/100 g)	Sorbitol (g/100 g)
Suc	96.23 ± 1.34 ^a	0.64 ± 0.08 ^a	n.d.	n.d.
Suc-R	95.08 ± 0.85 ^a	0.71 ± 0.05 ^a	n.d.	n.d.
Sor	72.28 ± 0.91 ^b	0.90 ± 0.13 ^{a, b}	0.34 ± 0.08 ^a	22.16 ± 0.85 ^a
Sor-R	71.51 ± 1.04 ^b	1.14 ± 0.17 ^b	0.42 ± 0.10 ^a	21.95 ± 0.66 ^a
Glu	71.36 ± 0.74 ^b	23.13 ± 0.92 ^c	0.40 ± 0.06 ^a	n.d.
Glu-R	71.29 ± 0.68 ^b	23.63 ± 0.88 ^c	0.44 ± 0.07 ^a	n.d.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki farklılıkları simgelemektedir ($P < 0.05$).

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

n.d.: tespit edilememiştir.

n.d.: not defined.

Çizelge 3. Sert şekerlerin DSC analizi ile camsı geçiş (T_g), erime sıcaklığı (T_m) ve erime entalpisini (ΔH) değerleri.

Table 3. DSC analysis of glass transition (T_g), melting temperature (T_m) and melting enthalpies (ΔH) of hard candies.

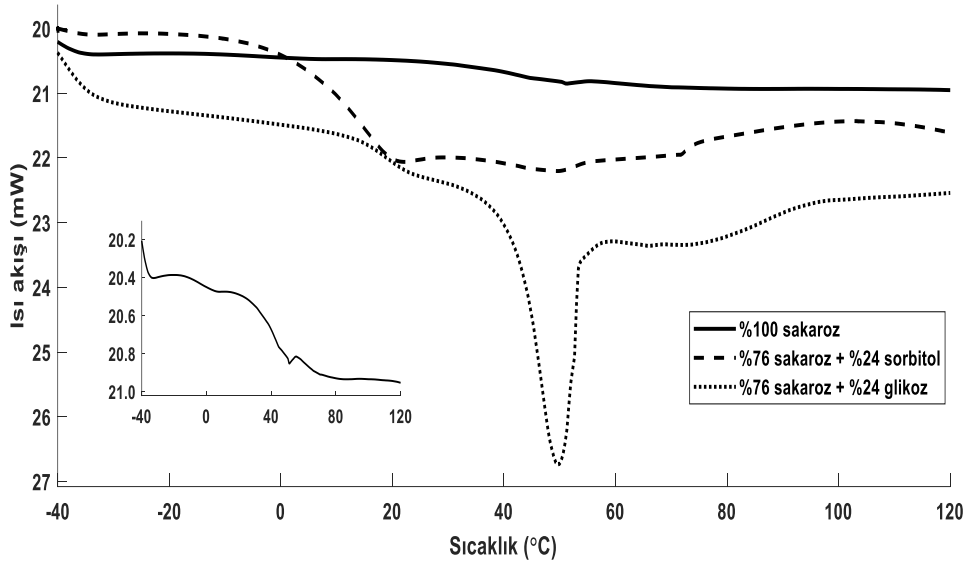
Örnek	T _g (°C)	T _m (°C)	ΔH (J/g)
Sample			
Suc	42.05 ± 1.80 ^a	51.37 ± 1.73 ^a	0.04 ± 0.01 ^a
Suc-R	44.16 ± 1.33 ^a	49.08 ± 1.58 ^a	0.03 ± 0.00 ^a
Sor	19.24 ± 0.79 ^b	n.d.	n.d.
Sor-R	19.06 ± 0.42 ^b	n.d.	n.d.
Glu	38.81 ± 1.24 ^c	46.45 ± 1.07 ^b	8.99 ± 0.44 ^b
Glu-R	36.39 ± 1.36 ^c	45.79 ± 1.30 ^b	7.55 ± 0.28 ^b

Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki farklılıkları simgelemektedir ($P < 0.05$).

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

n.d.: tespit edilememiştir.

n.d.: not defined.



Şekil 3. Sert şeker formülasyonlarının DSC termogramları.

Figure 3. DSC thermograms of hard candy formulations.

Sert Şekerlerin Duyusal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Gıda teknolojisinde yeni ürün geliştirmelerde veya mevcut ürüne yeni özellikler kazandırıldığında duyusal özelliklerin değerlendirilmesi önemli görülmektedir (Carpenter vd., 2012). Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen duyusal analiz sonuçları (Çizelge 4) değerlendirildiğinde farklı formülasyonların akide şekerlerin duyusal özellikleri olan görünüş, yapı, lezzet ve genel beğeni üzerine etkileri istatistik olarak anlamlı olduğu bulgulanmıştır ($P < 0.05$). Panelde ürünün tüketmeden önceki albenisinin test edildiği ‘görünüş’ kriterinde sorbitol ve glikozun yer aldığı formülasyonlar en yüksek puanlanırken; sakarozun %100 olduğu formülasyonlar daha düşük puanlanmıştır. Benzer şekilde ağızda yapışma, erime ve erime sonunda parçalanmasının test edildiği ‘yapı’ kriterinde de sakaroz diğer formülasyonlara kıyasla daha düşük puanlanmıştır. Sakarozun %100 yer aldığı formülasyonların duyusal analizde en az puanlanmasının temelinde camsı amorf yapının diğer formülasyonlara kıyasla ağızda çok hızlı bozulması olarak değerlendirilmiştir. Duyusal değerlendirmede şekerin yapı kriteri ile DSC analizi sonucunda elde edilen entalpi değerleri ilişkilendirilebilir. Her ne kadar sorbitole ait

entalpi değerleri hesaplanamasa da Suc, Suc – R ile Glu, Glu – R entalpi değerleri şekerin ağızda erimesi ile ilgili bulguları destekler niteliktedir. Geleneksel akide şekeri tadının alınıp alınmadığı ve tat, aroma özelliklerinin değerlendirildiği ‘lezzet’ kriterinde en yüksek puan glikozun yer aldığı formülasyonlarda bulgulanmıştır; ancak uygulanan Duncan testine göre sorbitol ve glikoza ait formülasyonlar aynı grup içinde yer almıştır. Ürünün topyekün değerlendirildiği ‘genel beğeni’ kriterinde ise şeker formülasyonlarının etkisi daha net görülmüştür. Buna göre formülasyonda glikozun yer aldığı akide şekerleri en yüksek puanlanırken bunu sırasıyla sorbitol ve sakaroz izlemiştir. Panelde kırmızı renkli ürünlerin de çok beğenildiği; ancak renksiz formülasyonların parlak – camsı görünüm özelliklerinden ötürü beğenildiği de vurgulanmıştır. Doğal renk maddesi ilavesi ile üretilmiş renklendirilmiş şekerlerden %100 sakarozun yer aldığı ürünler diğer iki formülasyona kıyasla ‘görünüş’ kriterinde daha düşük puanlanırken; formülasyonda glikoz ve sorbitolün yer aldığı renkli şekerlerin puanları arasında önemli fark bulunmamıştır ($P > 0.05$). Renklendirilmiş ürünlerde glikoz ve sorbitolün yer aldığı formülasyonların ‘görünüş’ kriterinde daha yüksek puanlanmasının sebebi yine parlak – camsı görünüme sahip olmalarıdır. Şekerleme

endüstrisinde sakaroz ve glikoz şurubu gibi şeker kaynakları yerine şeker oranını azaltma stratejisi olarak şeker alkollerin kullanımı üzerinde durulmaktadır. Bu kapsamda sorbitolün şekerlemelerde tatlılık oranını etkilememesi ve şekerleme ürünlerinin karakteristik görünüm ve organoleptik kalitesini en az etkileyen şeker alkol olması sebebiyle tercih edilen bir karbonhidrat olduğu vurgulanmaktadır (O'Brien-Nabors, 2016). Sorbitolün aynı zamanda sert şeker üretiminde teknolojik olarak üründe arzulanan

sertliği sağlamama ve yapışkanlık sorununa yol açabilme risklerinden ötürü formülasyonun dengeli bir şekilde ayarlanması güçlüğünden bahsedilmektedir (Klacić vd., 1984). Bu çalışma kapsamında kuru madde üzerinden %24 sorbitol ilavesi ile üretilmiş sert şekerlerin 'yapı' kriterinin duyusal olarak iyi – çok iyi olarak değerlendirildiği görülmüştür. Sert şekerleme üretiminde şeker oranının azaltılmasına yönelik olarak sorbitolün kullanılabilirliği bu çalışma kapsamında test edilmiştir.

Çizelge 4. Altı farklı formülasyonun sert şekerlerin duyusal özelliklerine etkisi.

Table 4. The effect of six different formulations on sensory properties of hard candies.

Örnek	Görünüş	Yapı	Lezzet	Genel beğeni
Sample	Appearance	Texture	Flavour	Overall acceptance
Suc	2.57 ± 1.34 ^a	2.64 ± 1.08 ^a	2.93 ± 1.14 ^a	2.50 ± 0.76 ^a
Suc-R	2.43 ± 0.85 ^a	2.71 ± 1.20 ^a	2.86 ± 1.41 ^a	2.64 ± 0.74 ^a
Sor	4.21 ± 0.89 ^b	4.43 ± 1.83 ^b	4.07 ± 0.73 ^b	3.57 ± 0.85 ^b
Sor-R	4.57 ± 0.65 ^b	3.14 ± 1.03 ^a	4.07 ± 0.73 ^b	3.93 ± 0.73 ^b
Glu	4.36 ± 0.74 ^b	4.71 ± 0.47 ^b	4.43 ± 0.76 ^b	4.64 ± 0.50 ^c
Glu-R	4.29 ± 0.83 ^b	4.29 ± 0.73 ^b	4.50 ± 0.52 ^b	4.50 ± 0.65 ^c

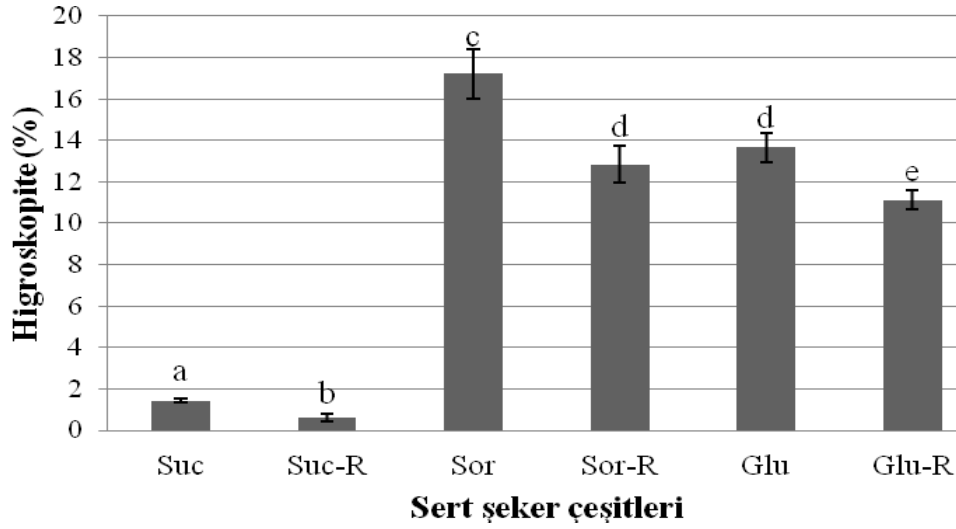
Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistikî farklılıkları simgelemektedir ($P < 0.05$).

Different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

Sert Şekerlerin Higroskopik Özellikleri

Akide şekerlerinin üretimi sonrasında nem alma kapasitesinin en az olması istenir. Akide şekerleri nem almaları durumunda su aktivitesi değerleri yükselir, camsı geçiş özellikleri bütünüyle değişebilir ve sonunda yapısal, duyusal özellikler başta olmak üzere üründe genel fiziksel ve kimyasal bozulmalar gözlenebilir. Ürüne uygulanan higroskopite analizi sonuçları değerlendirildiğinde hem şeker formülasyonlarının hem de doğal renk maddesi olarak SHK kullanımının ürün nem alma potansiyellerini etkilediği anlaşılmıştır ($P < 0.05$). Şekil 4 incelendiğinde en yüksek nem kazanma potansiyelinin formülasyonda sorbitolün yer aldığı akide şekerlerine ait olduğu görülmektedir. Yalnızca sakarozun yer aldığı formülasyonların ise belirgin olarak en düşük higroskopite değerlerine sahip olduğu anlaşılmaktadır. Gıdaların higroskopik özellikleri ile camsı geçiş sıcaklıkları arasında ilişki bulunmaktadır (Shrestha vd., 2007; Islam vd., 2016). Akide şekerlerinin Tg değerleri

incelendiğinde, en yüksek higroskopik özelliğe sahip olan Sor ve Sor – R numunelerinin diğer formülasyonlara kıyasla en düşük Tg değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, SHK kullanılarak doğal renk maddesi ile zenginleştirilen akide şekerlerinin tüm formülasyonlarda SHK ilavesiz şekerlere kıyasla daha düşük higroskopite değerlerine sahip olduğu da bulgulanmıştır. Literatür incelendiğinde, fenolik maddelerin film yapısı oluşturan sistemlerde nem geçişini belirgin olarak engelleyebileceği rapor edilmiştir (Insaward vd., 2015; Fabra vd., 2011; Friesen vd., 2015). Bu çalışmada da SHK fenolik maddelerinin akide şekerlerinin yüzeyinde bariyer rolü üstlenerek nem geçişini engellediği yorumu yapılabilir. Sert şekerin ortamdaki nem alması sonucunda amorf – camsı yapıdaki gıda amorf – kauçuk (rubbery) forma dönüşebilmekte; bu durum da üründe yapışkanlık, elastikiyet ve renk özellikleri başta olmak üzere fiziksel ve kimyasal değişikliklere yol açabilmektedir (Taub ve Singh, 1997).



Şekil 4. Sert şekerlerin altı farklı formülasyonunun %75 bağıl nemde (RH) nem kazanma potansiyelleri.

Figure 4. Moisture gaining potentials of six different formulations of hard candies at 75% relative humidity (RH).

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın belirli aşamalarında teknik desteklerini esirgemeyen İpek Pişmaniye San. Tic. Ltd. Şti (İzmit, Kocaeli) İşletme Müdürü Kemal Piroğlu'na ve Gıda Müh. Necati Özdemir'e yazarlar olarak teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

Altan, A. (2001). *Özel gıdalar teknolojisi*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın, 178 s.

Anonim (2017). Şekerli ve Çikolatalı Mamuller. Türkiye Cumhuriyeti Ekonomi Bakanlığı Sektör Raporları. https://ticaret.gov.tr/data/5b8700a513b8761450e18d81/Sekerli_ve_Cikolatali_Mamuller.pdf (Erişim Tarihi: 01.12.2018).

Cardoso, A.V., Abreu, W.M. (2004). Water and the glass transition temperature of organic (caramel) glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 348: 51-58.

Carpenter, R.P., Lyon, D.H., Hasdell, T.A (2012). *Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control*. 2nd Edition, Springer Science & Business Media, 201 p. ISBN: 0-8342-1642-6.

Demir, M.K., Elgün, A., Avcı, A. (2010). Klasik ve vakum altında spreylenerek pişirme

yöntemlerinin akide şekerinin bazı kalite kriterleri ve raf ömrü üzerine etkisi. *GIDA*, 35(6): 431-438.

Elgün, A. (2013). Şeker, şekerlemeler ve şekerli ürünler. *Uluslararası 2. Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi*, 77-96.

Ergun, R., Lietha, R., Hartel, R.W. (2010). Moisture and shelf life in sugar confections. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(2): 162-192.

Fabra, M.J., Hambleton, A., Talens, P., Debeaufort, F., Chiralt, A. (2011). Effect of ferulic acid and α -tocopherol antioxidants on properties of sodium caseinate edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(6): 1441-1447.

Finley, J. W., Hurst, W. J., Lee, C. Y. (2018). *Principles of Food Chemistry*, Springer.

Friesen, K., Chang, C., Nickerson, M. (2015). Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: Mechanical, barrier and cross-linking properties. *Food Chemistry*, 172: 18-23.

Gutiérrez-Zúñiga, C.G., Arriaga-Alba, M., Ordaz-Pichardo, C., Gutiérrez-Macías, P., Barragán-Huerta, B.E. (2014). Stability in candy products of neocandentone, a non-genotoxic purple pigment

- from *Dalbergia congestiflora* heartwood. *Food Research International*, 65: 263-271.
- Güvemli, O. (2018). Türkiye'nin yaşayan en eski işletmesi: Hacı Bekir Şekerleme 1777-2018. *Muhasebe ve Finans Tarihi Araştırmaları Dergisi*, 74-104.
- Hepsağ, F., Hayoğlu, İ., Hepsağ, B. (2012). Karadut meyvesinin antosiyanin içeriği ve gıda sanayinde renk maddesi olarak kullanım olanakları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7: 9-19.
- Insaward, A., Duangmal, K., Mahawanich, T. (2014). Mechanical, optical, and barrier properties of soy protein film as affected by phenolic acid addition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43): 9421-9426.
- Islam, M.Z., Kitamura, Y., Yamano, Y., Kitamura, M. (2016). Effect of vacuum spray drying on the physicochemical properties, water sorption and glass transition phenomenon of orange juice powder. *Journal of Food Engineering*, 169: 31-140.
- İlaslan, K. (2014). Sert şekerlemelerde kontrolsüz inversiyon ve soğuk erime problemlerinin araştırılması ve çözüm önerileri. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 84 s.
- İlter, I., Akyıl, S., Koç, M., Ertekin, F. (2017). Alglerden elde edilen ve gıdalarda doğal renklendirici olarak kullanılan pigmentler ve fonksiyonel özellikleri. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(12): 1508-1515.
- Karagül, N. (2012). Şekerleme endüstrisinde proses ve kirlenme profili ile artırılabilirlik bazı deneysel karakterizasyon. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 89 s.
- Klacik, K.J., Vink, W.V., Fronczkowski, P.R. (1984). Sorbitol-containing hard candy. US Patent 4,452,825.
- Koç, B.E., Türkyılmaz, M., Özkan, M. (2012). Siyah havuç suyu konsantresinin akide şekerlerinde renklendirici olarak kullanılması ve monomerik antosiyaninlerin depolama stabilitesinin belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 10(1): 30-39.
- Kuşat, N., Kösekahyaoğlu, L. (2011). Gıda sektöründe ürün ve iyileştirilmiş ürün inovasyonları: batı akdeniz bölgesi şekerleme, kakao ve çikolata alt sektörü üzerine bir uygulama. *Uluslararası Alanya İşletme Fakültesi Dergisi*, 3: 2.
- Lawless, H.T., Heymann, H. (2010). *Data relationships and multivariate applications*. In Sensory evaluation of food, Springer New York, 433-449 s.
- Mazza, G., Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. 1st Edition, CRC Press, 384 p. ISBN: 9781351078153.
- Mutlu, C., Tontul, S.A., Erbaş, M. (2018). Production of a minimally processed jelly candy for children using honey instead of sugar. *Food Science and Technology*, 93: 499-505.
- Nelson, J.M., Theodore, C. (1924). Influence of glucose and fructose on the rate of hydrolysis of sucrose by invertase from honey. *The Journal of Biological Chemistry*, 62: 139-147.
- Netramai, S., Kijchavengkul, T., Sompoo, P., Kungnimit, W. (2018). The effect of intrinsic and extrinsic factors on moisture sorption characteristics of hard candy. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(5): e13599.
- O'Brien-Nabors, L. (ed.). (2016). *Alternative sweeteners*. 3rd Edition, CRC Press, 553 s. ISBN: 0-8247-0437-1.
- Önder, K. (2016). Türkiye bisküvi, çikolatalı ve şekerli mamuller sektörü: firma yoğunlaşma analizi. *Dokuz Eylül Üniversitesi İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi Dergisi*, 31(2): 179-208.
- Özlu, Z. (2011). Osmanlı saray şekerleme ve şekerlemecileri ile ilgili notlar. *Türk Kültürü ve Hacı Bektaş Veli Araştırma Dergisi*, 58: 171-190.
- Reinheimer, M.A., Mussati, S.F., Scenna, N.J. (2012). Optimization of operating conditions of a cooling tunnel for production of hard candies. *Journal of Food Engineering*, 109(1): 22-31.
- Reinheimer, M. A., Mussati, S., & Scenna, N. J. (2010). Influence of product composition and

- operating conditions on the unsteady behavior of hard candy cooling process. *Journal of Food Engineering*, 101(4): 409-416.
- Rupérez, P., Toledano, G. (2003). Celery by-products as a source of mannitol. *European Food Research and Technology*, 216(3): 224–226.
- Schnepel, K., & Hoffmann, C. (2013). Calculation of invert sugar content based on the glucose content of sugar beet. *Sugar Industry*, 138(7): 463-470.
- Shrestha, A.K., Ua-Arak, T., Adhikari, B.P., Howes, T., Bhandari, B.R. (2007). Glass transition behavior of spray dried orange juice powder measured by differential scanning calorimetry (DSC) and thermal mechanical compression test (TMCT). *International Journal of Food Properties*, 10(3): 661-673.
- Smidova, I., Copikova, J., Maryska, M., Coimbra, A. (2003). Crystals in hard candies. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(5): 185-191.
- Subramaniam, P. (2016). *The stability and shelf life of food*. 2nd Edition, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 545-573.
- Sukkwai, S., Kijroongrojana, K., Chonpracha, P., Pujols, K.D., Alonso-Marengo, J.R., Ardoin, R., Prinyawiwatkul, W. (2018). Effects of colorant concentration and ‘natural colour’ or ‘sodium content’ claim on saltiness perception, consumer liking and emotion, and purchase intent of dipping sauces. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(5): 1246-1254.
- Tan, J., Kerr, W.L. (2017). Determination of glass transitions in boiled candies by capacitance based thermal analysis (CTA) and genetic algorithm (GA). *Journal of Food Engineering*, 193: 68-75.
- Taub, I.A., Singh, R.P. (eds.). (1997). *Food storage stability*. CRC Press, 510 p. ISBN 0-8493-2646-X
- Wang, Y., Truong, T., Li, H., Bhandari, B. (2019). Co-melting behaviour of sucrose, glucose & fructose. *Food Chemistry*, 275: 292-298.
- Wisnlak, J., Simon, R. (1979). Hydrogenation of glucose, fructose, and their mixtures. *Industrial Engineering Chemistry Product Research and Development*, 18(1): 50-57.
- Wongwivat, P., Wattanachant, S. (2014). Effect of sugar types on physical attributes and crystalline structure of sweet-dried chicken meat product. *International Food Research Journal*, 21(6): 2285-2291.
- Yilmaz, F.M., Bilek, S.E. (2018). Ultrasound-assisted vacuum impregnation on the fortification of fresh-cut apple with calcium and black carrot phenolics. *Ultrasonics sonochemistry*, 48: 509-516.
- Zellner, D., Greene, N., Jimenez, M., Calderon, A., Diaz, Y., Sheraton, M. (2018). The effect of wrapper color on candy flavor expectations and perceptions. *Food Quality and Preference*, 68: 98-104.

NAR KABUĞUNDAN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTEYE SAHİP FENOLİK BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

Tuğba Demir^{1*}, Özlem Akpınar², Haki Kara³, Hüseyin Güngör³

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü, Sivas, Türkiye

²Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat, Türkiye

³Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü, Sivas, Türkiye

Geliş / Received: 06.08.2018; Kabul / Accepted: 24.02.2019; Online baskı / Published online: 01.04.2019

Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. (2019). Nar kabuğundan antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu. GIDA (2019) 44 (2): 369-382 doi: 10.15237/gida.GD18081

Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. (2019). Optimization of the extraction conditions of phenolic compounds with antimicrobial and antioxidant activity from pomegranate peel. GIDA (2019) 44 (2): 369-382 doi: 10.15237/gida.GD18081

ÖZ

Bu çalışmada, nar kabuğunun fenolik, flavonoid, antioksidan ve antimikrobiyal, özellikleri araştırılmıştır. 17 farklı koşulda elde edilen ekstraktların fenolik ve flavonoid bileşiklerinin ekstraksiyon (sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu) koşulları, cevap yüzey metodu kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarının sonunda nar kabuğu için 78°C, %33 etanol konsantrasyonu, 113 dakika optimum koşul olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstraktların yüksek oranda antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların fenolik bileşikleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile analiz edilmiş, nar kabuğu ekstraktlarının en fazla kuarsetin ve epikateşin içerdiği bulunmuştur. Sonuçlar, nar kabuklarının gerek gıda gerekse gıda dışı endüstrilerde, önemli bir kaynak olarak da kullanım potansiyeli olabileceğini desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: Nar kabuğu, fenolik bileşik, flavonoid, antioksidan, antimikrobiyel, HPLC

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTION CONDITIONS OF PHENOLIC COMPOUNDS WITH ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM POMEGRANATE PEEL

ABSTRACT

In this study, phenolic, flavonoid, antioxidant and antimicrobial properties of pomegranate peel were investigated. The extraction conditions (temperature, time and ethanol concentration) of phenolic and flavonoid compounds obtained under 17 different conditions were optimized using the response surface method. At the end of optimization studies; for pomegranate peels; 78°C, 33% ethanol concentration 113 minutes were determined as the optimum conditions. The obtained extracts were found to have high antioxidant and antimicrobial activity. Phenolic compounds of the extracts obtained under optimum conditions were analyzed by high pressure liquid chromatography and pomegranate peels extracts were found to contain the most quercetin and epicatechin. The results support that pomegranate peels may be potentially useful as an important source of food or non-food industries.

Keywords: Pomegranate peel, phenolic compound, flavonoid, antioxidant, antimicrobial, HPLC

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉ tugbilim@hotmail.com

☎ (+90) 346 219 1010/ 2595

☎ (+90) 346 219 1812

GİRİŞ

Punicaceae ailesinin içinde yer alan nar meyvesi; antik dönemlerden bu yana mistik özellikleriyle ön plana çıkan, oldukça farklı özelliklere sahip bir meyvedir. Binlerce yıldır farklı medeniyetler tarafından, halk arasında tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmıştır (Bayram vd., 2010). Son yıllarda, çok yönlü ve besleyici olması nedeniyle popülerlik kazanmıştır. Türkiye’de son yıllarda nar üretiminin 5 kat arttığı gözlenmektedir (TUİK 2017). Nar meyvesi, hastalık riskini azalttığı bildirilen tanen ve diğer biyokimyasallardan özellikle fenolik bileşikler açısından zengindir (Jaiswal ve Porter, 2010).

Son yıllarda, strese bağlı kronik hastalıkların artması, antibiyotiklerin gelişi-güzel kullanımı nedeniyle, insan patojeni bakterilerin ilaçlara karşı direnç kazanması antioksidan ve antimikrobiyel etkili fenolik bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır. Fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi oksidatif süreci azalttığından, hem insan vücudunda hem de gıda sistemlerinde oksidatif değişiklikleri kontrol etmede önemli bir rol oynamaktadır (Samaranayaka vd., 2011).

Narın fenolik bileşikler açısından da zengin olduğu yapılan birçok çalışma ile belirtilmiştir (Wang vd., 2010; Prakash ve Prakash, 2011; Amyrgialaki vd., 2014; Nahar vd., 2014). Li vd., (2006)’nın nar kabukları üzerine yaptıkları çalışmada kabuk ve posa kısımlarında toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve pro-antosiyanidin miktarları ayrı ayrı incelenmiş ve kabuk kısmında bu maddelerin daha yüksek olduğunu (Li vd., 2006) ayrıca antioksidan aktivitenin hem posadan hem de sentetik antioksidanlardan daha üstün olduğu saptanmıştır (Singh vd., 2002; Negi ve Jayaprakasha, 2003; Zoral ve Turgay, 2014). Nar meyvesinin ve kabuğunun antosiyaninler, gallotanenler, hidroksisünamik asit, hidroksibenzoik asitler ile elajitanenler ve gallagil esterler gibi hidrolize edilebilir tanenler içerdiği tespit edilmiştir (Yılmaz ve Usta, 2011). Nar kabuklarının bakterileri gelişimini inhibe ettiği (Scalbert ve Sandos, 2000; Al Zoreky, 2009; Panichayupakaranant vd., 2010; Sweetie vd., 2010) patojen mikroorganizmaların enzim aktivitelerini durdurarak ve hücre

membranlarındaki elektron taşıma sistemini engelleyerek antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Prasanth vd., 2001).

Her ne kadar nar kabukları ile ilgili çalışmalar olsa da, hala fenolik maddelerin etkin bir şekilde ekstraksiyonu ve ekstrakte edilen bu bileşiklerin biyolojik aktivitesinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bu çalışmada nar kabuklarından yüksek miktarda fenolik bileşik ekstraksiyonu için ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş ve optimizasyon için istatistiksel ve matematiksel testlerin kombine kullanıldığı cevap yüzey yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde; sistemin verdiği cevabı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için modelleme teknikleri kullanılmakta ve bunun yanında proses değişkenlerinin sistemin cevabında istenen etkiyi gösterdiği seviyelerin bulunması amaçlanmaktadır (Myers vd., 1995).

Bu çalışmanın amacı nar kabuklarından antioksidan ve antimikrobiyel özelliğe sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun koşulları belirlemektir. Nar kabuklarının toplam fenolik ve flavonoid miktarlarının en fazla olacak şekilde ekstraksiyonunu sağlayabilmek amacıyla etanol/su oranı, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık bakımından optimize edilmiş, farklı koşullarda elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri de incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Nar (*Punica granatum* L.) kabukları yerel marketlerden temin edilen nar meyvesinden elde edilmiş olup, etüvde (40°C) kurutulmuştur. Kabuklar öğütülerek, +4°C’de analiz edilinceye kadar depolanmıştır. Eosin Metilen Blue (EMB), Chapman Agar, Sabouraud Glikoz Agar, Mueller Hinton Agar (MHA) ve Mueller Hinton Broth (MHB) Merck (Merck KGaA, Almanya) firmasından alınmıştır. *E. coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *S. aureus* (ATCC 29213), *Aspergillus flavus* (ATCC 9170) ve *Aspergillus niger* (ATCC 6275) mikroorganizmaları Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Ampicillin

antimikrobiyal duyarlılık diski Oxoid™ (Thermo Fisher Scientific, ABD)'den alınmıştır. Brownlee Analitik C18 (4.6 x 250mm, 5µm) HPLC kolonu Perkin Elmer'den (ABD) temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik standartta olup Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) veya Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) firmalarından alınmıştır.

Yöntem

Ekstraksiyon ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Öğütülmüş kabuklar; 10:1 (mL solvent/g bitki) oranında solvent ile karıştırılmış ve farklı sıcaklık ve sürelerde ekstraksiyona tabi tutularak ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Ekstraksiyon süresi sonunda örnekler santrifüj (5000 rpm'de 10 dakika) sonra da filtre edilerek ekstraktlar elde edilmiş ve -18°C'de muhafaza edilmiştir (Cai vd., 2004).

Deneyel Tasarım ve Cevap Yüzey Metodu (Response Surface Methodology-RSM) ile Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Bağımsız değişkenler için değer aralıklarının seçiminde literatür taraması sonuçlarından yararlanılarak; fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu etanol konsantrasyonu, sıcaklık ve süre bakımından optimize edilmiştir. Nar kabuğu ekstraksiyonları için denenen bağımsız değişkenlerin değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarının yüksek olduğu koşullar optimum ekstraksiyon koşulları olarak seçilmiştir. Optimum koşullar için seçilen model aşağıdaki eşitlikte (Eşitlik 1) açıklanmıştır:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{Eş. 1})$$

Çizelge 1. Nar kabukları ekstraksiyonu için bağımsız değişkenlerin değerleri

Table 1. Independent variables for the pomegranate peels extraction

	Bağımsız Değişkenler <i>Independent Variables</i>	Sembol <i>Symbol</i>	-1	0	+1
Nar kabuğu <i>Pomegranate peel</i>	Etanol (%) <i>Ethanol</i>	X ₁	25	50	75
	Süre (dk) <i>Time (min)</i>	X ₂	20	70	120
	Sıcaklık (°C) <i>Temperature</i>	X ₃	40	60	80

Eşitlikte 1'de Y bağımlı değişkenleri (toplam fenolik ve flavonoid) b₀ sabit, b₁, b₂ ve b₃ lineer terimleri, b₁₁, b₂₂ ve b₃₃ kuadratik terimleri ve X₁, X₂ ve X₃ bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. Design-Expert V7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis) programı elde edilen dataların regresyon ve grafiksel analizi için kullanılmıştır. Fischer's testi model eşitliğini elde etmek için, Student's t-testi regresyon katsayılarının istatistiksel önemini bulmak için kullanılmıştır.

Toplam Fenolik Madde Tayini

Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri Singleton ve Rossi (1965) tarafından tanımlanan yöntemle göre belirlenmiştir. 2 N 100 µL Folin-Ciocalteu fenol ayracı, 100 µL ekstrakt, 2.3 mL saf su ve 1 mL %7 sulu sodyum karbonat çözeltisi karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiş ve süre sonunda örneklerin 750 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülmüştür.

Sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak açıklanmıştır.

Toplam Flavonoid Miktarlarının Belirlenmesi

Nar kabuğu ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları Zhishen (1999)'a göre belirlenmiştir. Ekstraktlar %5 NaNO₂, %10 AlCl₃ ile ve 1 M NaOH ile reaksiyona sokulmuştur. Karışımların 510 nm'de absorbansları okunmuş ve toplam flavonoid miktarları kuarsetin eşdeğeri (KE) olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan Aktivite

Radikal Süpürme Aktivitesi – DPPH: 1.95 mL 2.2 difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) çalışma çözeltisi ile ve 50 µL ekstraktlar/50 µL Troloks standart çözeltileri karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda spektrofotometrede 517 nm dalga boyundaki

absorbansları ölçülmüştür (Brand-Williams vd., 1995). Sonuçlar Troloks eşdeğeri (TE) olarak açıklanmıştır.

Demir (III) İndirgeme Antioksidan Gücü – FRAP: FRAP yöntemiyle antioksidan kapasite tayini için 300 mM sodyum asetat (pH 3.6) tampon çözeltisi, 20 mM sulu demir (III) klorür çözeltisi ve 10 mM sulu 2.4.6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) çözeltisi hazırlanıp 10/1/1 oranında karıştırılarak FRAP çalışma çözeltisi elde edilmiştir. 2.9 mL FRAP çalışma çözeltisi ile 100 µL ekstraktlar/100 µL Troloks standart çözeltileri karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda örneklerin absorbansları 593 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Sonuçlar TE olarak açıklanmıştır (Benzie ve Strain, 1996).

Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi – TEAC: TEAC yöntemiyle antioksidan kapasite tayini için 7 mM sulu ABTS [2.2'-Azino-bis (3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit)] çözeltisi ve 2.45 mM sulu potasyum persülfat çözeltisi karışımı (1/1, v/v) 16 saat süreyle oda sıcaklığında karanlık bir ortamda reaksiyona bırakılmış, ABTS radikal katyonu (ABTS'+) stok çözeltisi elde edilmiştir. ABTS'+ çalışma çözeltisi, 2.9 ml, 100 µL ekstrakt ile karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda absorbansı 734 nm dalga boyundaki ölçülmüştür. Sonuçlar TE olarak açıklanmıştır (Re vd., 1999).

Antimikrobiyel Aktivite

Antimikrobiyel aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmaların (*E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *A. flavus* ve *A. niger*) üretiminde *E. coli* ve *E. faecalis* için EMB agar, *S. aureus* için Chapman agar (Staphylococcus Selective Agar), küfler için ise Sabouraud glikoz agar kullanılmıştır.

Disk Difüzyon Yöntemi

Ekstraktların antimikrobiyel aktiviteleri Ebrahimabadi vd. (2010), tarafından belirtilen disk difüzyon yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Mikroorganizmaların (Bakteri ve Küf) katı besiyerlerinde üretilmiş 18-24 saatlik taze kültürlerinden alınan koloniler serum fizyolojik içinde süspanse edilip ve 0.5 McFarland

bulanıklık tüpüyle kıyaslanarak 10^8 kob/mL'lik dilüsyonları hazırlanmıştır. MHA içeren petrilere bakteri dilüsyonundan 100 µl ekim yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlar (direkt kullanılmıştır) 6 mm çapındaki steril boş disklerle emdirilmiş, diskler petrilere yerleştirildikten sonra bakteriler 37°C'de, küfler ise 30°C'de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür. Kontrol olarak ekstraksiyon solventi, su ve standart antibiyotik disk olan Ampicillin kullanılmıştır.

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Tayini

Ekstraktların minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) değerlerini belirlemede Oskay vd. (2007), tarafından açıklanan makrobroth yöntemi esas alınmış ve modifiye edilerek kullanılmıştır. Hazırlanan her bir mikroorganizma kültürlerinden (18 saatlik) 25 µL (1×10^8 kob/mL), 3 mL MHB ve 10 mL farklı dilüsyonlarda hazırlanan ekstraktlara (30 mg bitki/mL-0.46 mg bitki/ mL) aktarılmıştır. Daha sonra bakteriler 37°C'de, küfler ise 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra üremenin görülmediği tüplerdeki en düşük konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir. Ayrıca bulanıklık oluşmayan tüplerden 50 µL alınarak MHA'ya ekim yapılmış, büyüme olup olmadığı kontrol edilmiş ve bu şekilde Minimum Bakterisit Konsantrasyonu (MBK) da belirlenmiştir. Kontrol olarak ampicillin kullanılmıştır.

Fenolik Bileşiklerin Tanımlanması

Optimum koşullarda hazırlanan ekstraktların fenolik bileşik içerikleri kantitatif olarak DAD detektöre (Diode-Array Detektör; Perkin Elmer Model Flexar, USA) sahip Perkin Elmer yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminde analiz edilmiştir. Sistemde kolon olarak Brownlee Analitik C18 (4.6 x 250mm, 5µm) kolonu (Perkin Elmer) kullanılmıştır. Ortofosforik asit ile pH'sı 2.5'e ayarlanan su Solvent A, asetonitril ise Solvent B olarak kullanılmıştır ve kullanılan solvent sistemi Çizelge 2'de verilmiştir. Örnekler 25°C'de 0.8 mL/dk akış hızı, asetonitril-ortofosforik ile asitlendirilen su gradient ile kolondan elut edilmiştir.

Çizelge 2. HPLC’de kullanılan solvent sistemi
Table 2. Solvent system used in HPLC

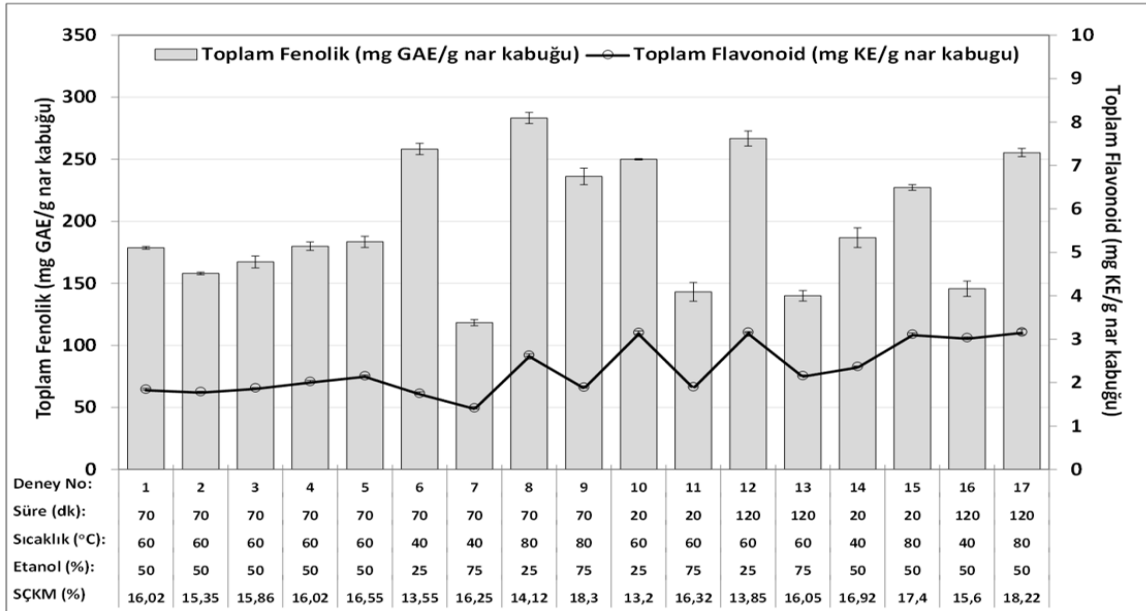
	Solvent A <i>Solvent A</i>	Solvent B <i>Solvent B</i>	Süre (dk) <i>Time (min)</i>
1	100-91	0-9	12
2	91-87	9-13	8
3	87-67	13-33	12
4	67-57	33-43	10
5	57	43	18
6	100	0	10

BULGULAR VE TARTIŞMA

Toplam Fenolik ve Flavonoid Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Çalışmada incelenen nar kabuklarının farklı sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonlarından oluşan, deneysel tasarım sonucu elde edilen 17 farklı koşulda ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 1’de sunulmuştur. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid sonuçları incelendiğinde, etanol konsantrasyonunun artışı, ekstraksiyonlarda elde edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarını azaltırken, sıcaklık ise artırmıştır.

Ekstraksiyon süresinin ise elde edilen ekstraktların toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği üzerine etkisi önemli olarak tespit edilmemiştir. Toplam fenolik madde miktarında en yüksek değer 283.28 mg GAE/g nar kabuğu olarak Deney 8’de (%25, 80°C, 70 dk) gözlemlenmiştir, en fazla toplam flavonoid madde miktarı ise 3.17 mg KE/g nar kabuğu olarak Deney 17’de (%50, 80°C, 120 dk) elde edilmiştir. Nar kabuğu için bağımsız değişkenlerden etanol konsantrasyonunun artışı, ekstraksiyonlarda elde edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarını azaltırken, sıcaklık ile artırmıştır. Ekstraksiyon süresinin ise elde edilen ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içeriği üzerine etkisi önemli olarak tespit edilmemiştir. Literatürde nar kabuğunun süre ve sıcaklık değişkenlerinin, ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada; en yüksek verimin etanol ile 45°C’de 60 dakikada elde edildiği bildirilmiştir (59.2 mg GAE/g nar kabuğu) (Pan vd., 2011). Farklı bir çalışmada ise nar kabuklarının değişen etanol konsantrasyonlarında ve farklı sürelerde elde edilen ekstraktlarının toplam fenolik madde verimleri karşılaştırılmış, en yüksek verim %63 etanol konsantrasyonunda 22 dk da, %14.8 olarak tespit edilmiştir (25°C) (Li vd., 2006).



SCKM: Suda Çözünür Kuru Madde

Şekil 1. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri

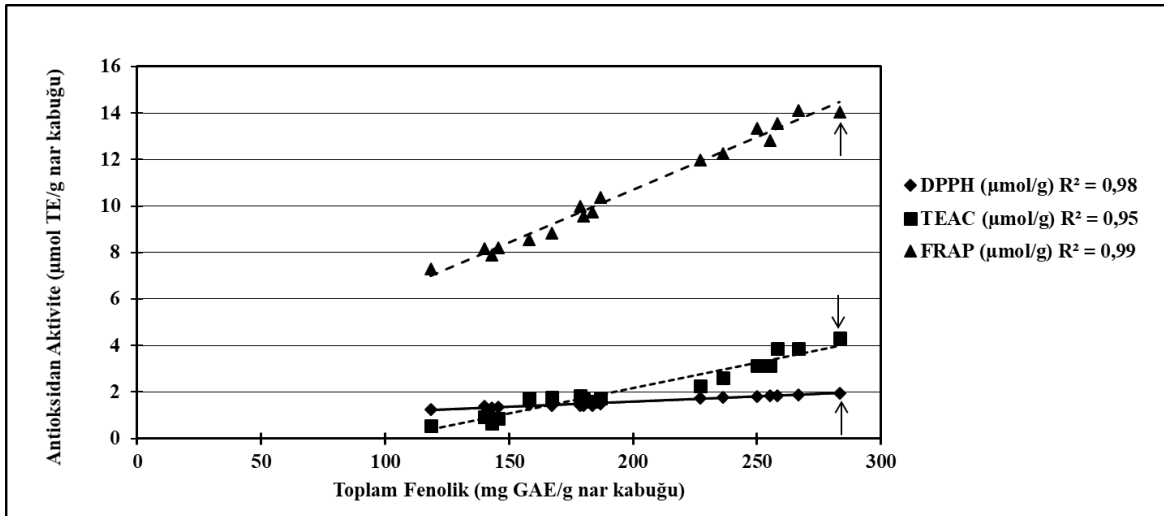
Figure 1. Total phenolic and flavonoid content of pomegranate peel extracts

Bir başka çalışmada da en yüksek oranda fenolik bileşikler 28.29 mg GAE/g nar kabuğu ile %64 etanol konsantrasyonunda, 60°C'de, 25 dk da elde edilmiştir (Wang vd., 2008). Sonuçlar literatür bulguları ile kıyaslandığında, daha yüksek sıcaklık ve sürede, buna karşın daha düşük etanol konsantrasyonu ile elde edilen nar kabuğu ekstraktlarında en yüksek verime ulaşılmıştır.

Ekstraktların Antioksidan Özellikleri

İncelenen nar kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri, radikal süpürme aktivitesi-DPPH, TEAC ve FRAP yöntemleri ile ölçülmüştür. Antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin yapıları ve özellikleri birbirinden çok farklı olduğundan,

tek bir yöntem ile ölçüm yetmemektedir. Bu nedenle birden fazla ölçüm yöntemi ile antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi gerekmektedir (MacDonald vd., 2006). Nar kabuklarının farklı koşullarda elde edilen ekstraktlarının, en yüksek antioksidan aktivitesi Deney 8'de (%25, 80°C, 70 dk) gözlemlenmiştir ve DPPH, FRAP ve TEAC ile ölçülen antioksidan aktiviteleri sırasıyla 1.95 $\mu\text{mol TE/g}$, 14.03 $\mu\text{mol TE/g}$, 4.32 $\mu\text{mol TE/g}$ nar kabuğu olarak bulunmuştur. Denenen tüm koşullarda nar kabuklarının antioksidan aktivitelerinin yüksek olduğu ve elde edilen ekstraktların; fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktiviteleri arasında da yüksek korelasyon görülmüştür ($R^2 > 0.9$) (Şekil 2).



Şekil 2. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki

Figure 2. The relation between total phenolic content and antioxidant activity of pomegranate peel extracts

Ekstraktların Antimikrobiyel Özellikleri

Literatürde pek çok bitkinin patojenlere karşı oluşturduğu bir seri reaksiyon sonucunda antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Fenolik bileşikler ve türevleri, bitkilerin savunma sisteminde önemli bileşiklerdir ve patojen bir çok mikroorganizmanın gelişmelerini durdurucu yönde etki etmektedir (Araújo vd., 2017). Mikroorganizma gelişmesini durdurmak ve daha sonrasında oluşabilecek ikincil bir enfeksiyonun önüne geçebilmek, bitkisel kökenli antimikrobiyel ajanlarda beklenen özelliklerdir (Farag vd., 2015). Bu çalışmada, gıda kaynaklı çeşitli enfeksiyonlara (bakteriler) ve

intoksikasyonlara (küfler) neden olan birçok bakteri ve küf arasından en önemli ve en sık karşılaşılan mikroorganizmalar seçilmiştir. Bakterilerin seçiminde kendi aralarında farklılık gösteren gruplar göz önünde bulundurulmuştur (*S. aureus*; Gram (+), fakültatif anaerob, hareketsiz kok; *E. faecalis*; Gram (+), aerobik, hareketsiz kok; *E. coli*; Gram (-), fakültatif anaerob, hareketli basil; *A. niger*; Aflatoksin B₂; *A. flavus*; Aflatoksin B₁) (Anonim, 2016, Girgin vd., 2001).

Nar kabuğu ekstraktlarının seçilen bakteriler ve küfler için en yüksek antibakteriyel ve antifungal aktivitesi, Deney 8'de (%25, 80°C, 70 dk)

saptanmış, inhibisyon zon çapları ise; sırasıyla *S. aureus* için 23.0 mm, *E. faecalis* için 18.5 mm, *E. coli* için 16.5 mm, küflerde; *A. niger* için 20.5 mm ve *A.flavus* için 17.5 mm olarak bulunmuştur. MİK

ler ise Deney 8’de sırasıyla 1.87 mg/mL, 3.75 mg/mL, 3.75 mg/mL, 1.87 mg/mL, ve 3.75 mg/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 3. Nar kabuğu ekstraktlarının minimum inhibisyon ve minimum bakterisit konsantrasyonları
Table 3. Minimum inhibition and minimum bactericidal concentrations of pomegranate peel extracts

Deney Numarası	Etanol (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	<i>S. aureus</i> (mg bitki /mL)		<i>E.fecalis</i> (mg bitki /mL)		<i>E.coli</i> (mg bitki /mL)		<i>A.niger</i> (mg bitki /mL)		<i>A.flavus</i> (mg bitki /mL)	
				MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK	MİK	MBK
1	50	60	70	3.75±0.00	3.75-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-
2	50	60	70	3.75±0.00	3.75-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-
3	50	60	70	3.75±0.00	3.75-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-
4	50	60	70	3.75±0.00	3.75-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-
5	50	60	70	3.75±0.00	3.75-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-
6	25	40	70	1.87±0.00	1.87-	3.75±0.00	3.75-	7.50±0.00	7.50-	3.75±0.00	3.75-	3.75±0.00	3.75-
7	75	40	70	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-
8	25	80	70	1.87±0.00	1.87-	3.75±0.00	3.75-	3.75±0.00	3.75-	1.87±0.00	1.87-	3.75±0.00	3.75-
9	75	80	70	3.75±0.00	3.75-	7.50±0.00	7.50-	7.50±0.00	7.50-	3.75±0.00	3.75-	3.75±0.00	3.75-
10	25	60	20	3.75±0.00	3.75-	7.50±0.00	7.50-	7.50±0.00	7.50-	3.75±0.00	3.75-	3.75±0.00	3.75-
11	75	60	20	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-
12	25	60	120	1.87±0.00	1.87-	3.75±0.00	3.75-	3.75±0.00	3.75-	1.87±0.00	1.87-	3.75±0.00	3.75-
13	75	60	120	3.75±0.00	3.75-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-
14	50	40	20	3.75±0.00	3.75-	7.50±0.00	7.50-	7.50±0.00	7.50-	3.75±0.00	3.75-	7.50±0.00	7.50-
15	50	80	20	3.75±0.00	3.75-	7.50±0.00	7.50-	7.50±0.00	7.50-	3.75±0.00	3.75-	7.50±0.00	7.50-
16	50	40	120	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-	15.00±0.00	15.00-	7.50±0.00	7.50-	15.00±0.00	15.00-
17	50	80	120	1.87±0.00	1.87-	7.50±0.00	7.50-	7.50±0.00	7.50-	3.75±0.00	3.75-	3.75±0.00	3.75-
	Ampicillin			0.48±0.00	0.48	0.48±0.00	0.48-	0.48±0.00	0.48-	0.96±0.00	0.48-	0.96±0.00	0.96-

Üreme yok

Ekstraktların fenolik madde içerikleri ile antimikrobiyel aktiviteleri arasındaki ilişki Şekil 3’de sunulmuştur ve incelenen nar kabuğu ekstraktlarının farklı mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyel aktivite ile fenolik madde içerikleri arasında yüksek korelasyon tespit edilmiştir ($R^2 > 0.87$).

İstatistiksel Modelleme

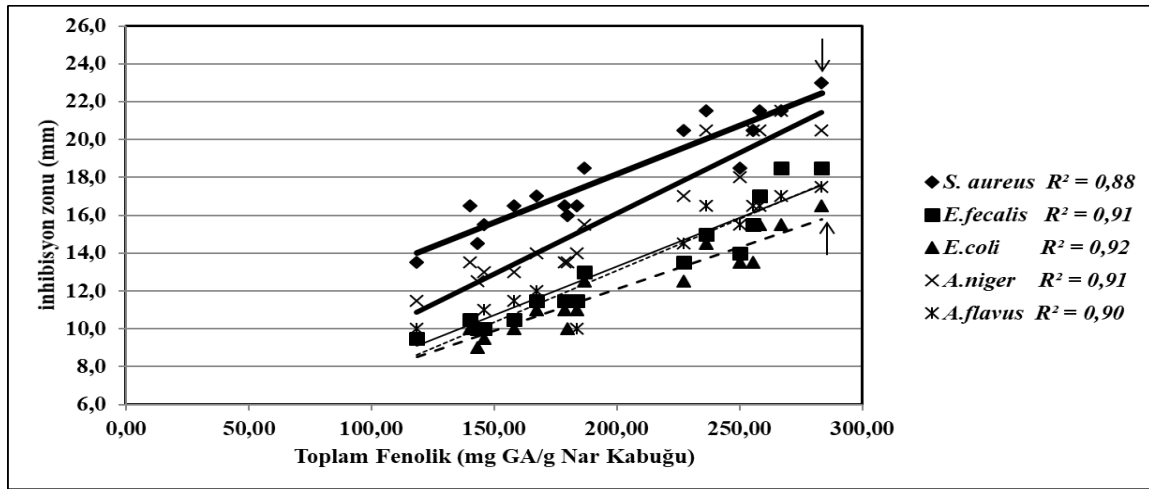
Yüksek oranda fenolik ve flavonid bileşiklerin ekstraksiyonu için; nar kabukları sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu bakımından 17 farklı koşulda ekstrakte edilmiştir. İncelenen koşullara göre nar kabuklarının fenolik ve flavonoid miktarlarının oldukça farklı olduğundan (Şekil 1), elde edilen verilerin optimize edilmesi gerekmektedir. Optimizasyon sonucu elde edilen

verilere göre kuadratik model eşitlik 2 ve 3’te sunulmuştur.

$$Y_1 = 173.48 - 52.58X_1 + 36.61X_2 + 0.09X_3 + 23.37X_1^2 + 27.16X_2^2 + 3.14X_3^2 + 23.18X_1X_2 - 4.99X_1X_3 + 17.33X_2X_3 \quad (Eş.2)$$

$$Y_2 = 1.94 - 0.41X_1 + 0.28X_2 + 0.12X_3 - 0.17X_1^2 + 0.16X_2^2 + 0.82X_3^2 - 0.1X_1X_2 + 0.05X_1X_3 - 0.15X_2X_3 \quad (Eş. 3)$$

ANOVA ile değerlendirilen toplam fenolik ve flavonoid miktarları için regresyon katsayıları sırasıyla 0.98 ve 0.95 olarak bulunmuş olup, her iki model de uyum eksikliği göstermemiş ve regresyon %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4 ve Çizelge 5).



Şekil 3. Nar kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları ile antimikrobiyal aktiviteleri arasındaki ilişki

Figure 3. The relationship between the total phenolic content and the antimicrobial activity of pomegranate peel extracts

Çizelge 4. Nar kabuğundan elde edilen toplam fenolik maddeler için ANOVA çizelgesi

Table 4. ANOVA table for the total phenolic substances obtained from the pomegranate peel

Kaynak Source	Kareler toplamı Sum of squares	Serbestlik derecesi Degree of freedom	Karelerin ortalaması Average of squares	F-değeri F-value	p-değeri p-value
Model Model	42147.99	9	4683.11	40.05	< 0.0001
Residual Residual	818.59	7	116.94		
Uyum eksikliği Lack of fit	368.06	3	122.69	1.09	0.4496
Saf hata Pure error	450.54	4	112.63		
Toplam Total	42966.58	16			

R²: 0.98, Adj R²: 0.96, C.V. % : 5.44

Çizelge 5. Nar kabuğundan elde edilen toplam flavonoid maddeler için ANOVA çizelgesi

Table 5. ANOVA table for the total flavonoids substances obtained from pomegranate peel

Kaynak Source	Kareler toplamı Sum of squares	Serbestlik derecesi Degree of freedom	Karelerin ortalaması Average of squares	F-değeri F-value	p-değeri p-value
Model Model	5.32	9	0.59	13.55	0.0012
Residual Residual	0.31	7	0.04		
Uyum eksikliği Lack of fit	0.22	3	0.07	3.20	0.1452
Saf hata Pure error	0.09	4	0.02		
Toplam Total	5.62	16			

R²: 0.95. Adj R²: 0.88. C.V. % : 8.99

Şekil 4 ve 5'te nar kabuğundan elde edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarına sıcaklık, süre ve konsantrasyonun etkisini gösteren cevap yüzey ve kontür grafikleri gösterilmiştir. Şekil 4A ve 5A'da 70 dakika ekstraksiyon sonucunda sıcaklık ve çözücü konsantrasyonun fenolik ve flavonoid madde elde edilmesindeki etkisi sunulmuştur. Buna göre maksimum fenolik maddeye (290 mg GAE/g nar kabuğu) 80°C'de %25 etanol konsantrasyonunda, maksimum flavonoid maddeye (2.72 mg KE/g nar kabuğu) ise 25 dakikada 80°C'de %25 etanol konsantrasyonunda erişilmiştir. Şekil 4B ve 5B'de sıcaklık 60°C'de sabit tutulduğunda etanol konsantrasyonunun ve sürenin fenolik ve flavonoid madde elde edilmesindeki etkisi görülmektedir. Maksimum fenolik maddeye (258 mg GAE/g nar kabuğu) %25 konsantrasyonunda ve 120 dakikada, maksimum flavonoid maddeye (3.07 mg KE/g nar kabuğu) ise %25 konsantrasyonunda ve 120 dakikada erişilmiştir (3.07 mg KE/g nar kabuğu). Şekil 4C ve 5C %50 etanol konsantrasyonu sabit tutulduğunda, maksimum fenolik ve flavonoid madde

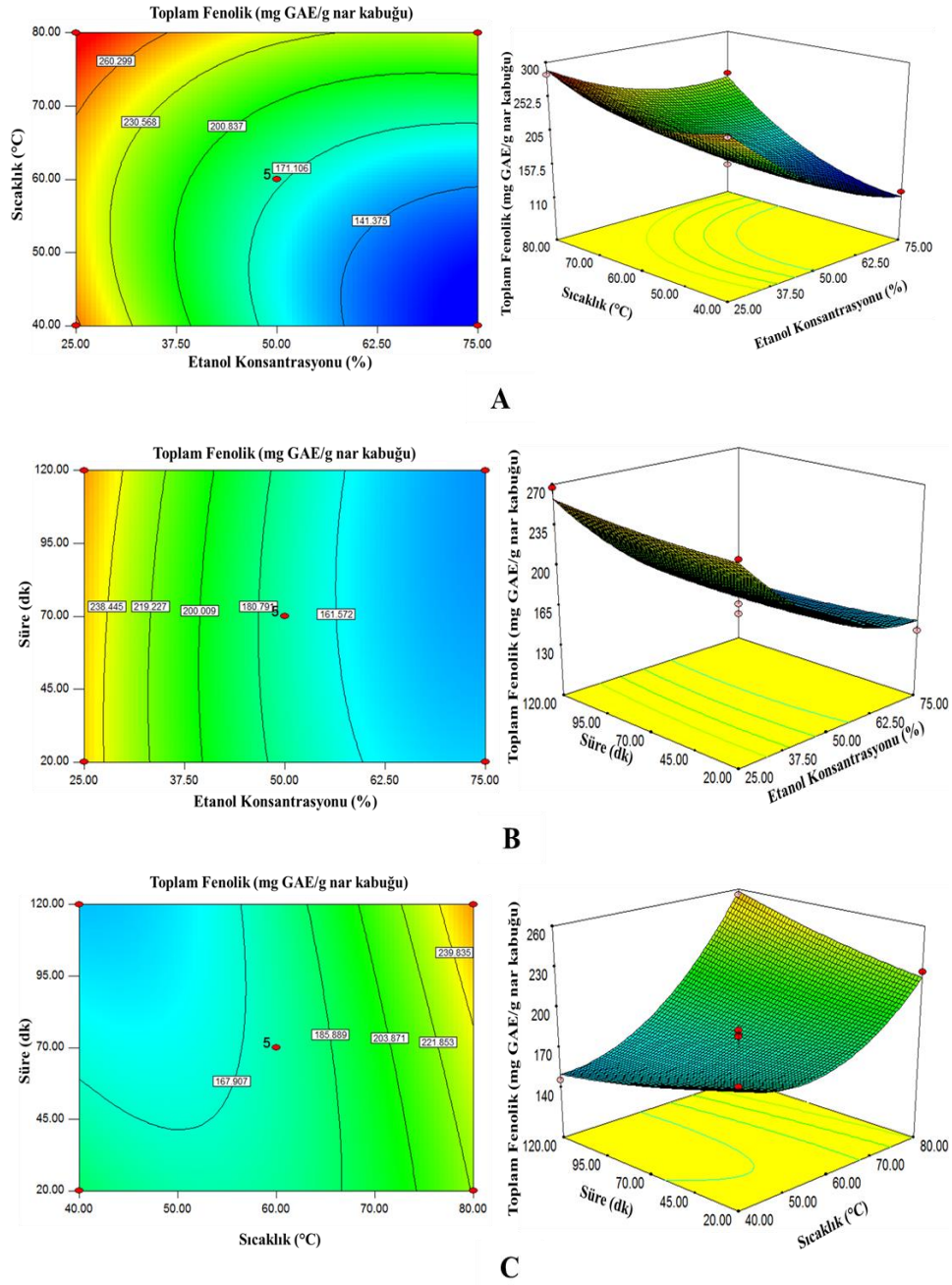
miktarlarının 258 mg GAE/g nar kabuğu ve 3.23 mg KE/g nar kabuğu olarak 80°C sıcaklıkta 120 dakika ekstraksiyon süresi sonunda olduğunu göstermektedir.

Fenolik ve flavonoid bileşikleri yüksek oranda üretmek için ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş; fenolik bileşikler miktarının 250 mg GAE/g nar kabuğundan fazla ve flavonoid bileşikler miktarının 1,42 mg KE/g nar kabuğundan fazla olması için yapılan optimizasyon çalışmalarında program tarafından önerilen koşullar arasından %33 etanol, 78°C ve 113 dakika optimum koşul olarak seçilmiştir (Çizelge 6). Bu koşullarda yapılan deneyler sonucunda toplam fenolik miktarı ve flavonoid miktarı sırasıyla 319.25 mg GAE/g nar kabuğu ve 3.27 mg KE/g nar kabuğu olarak bulunmuştur. Program ise aynı koşullar altında, toplam fenolik miktarını 280 mg GAE/g nar kabuğu ve flavonoid miktarını ise 3.16 mg KE/g nar kabuğu olarak tahmin etmiştir. Deneysel verilerden elde edilen bulgular, programın tahmin ettiği değerlerden yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 6. Optimizasyon koşulları ve optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktların toplam fenolik, flavonoid, antioksidan aktivite sonuçları

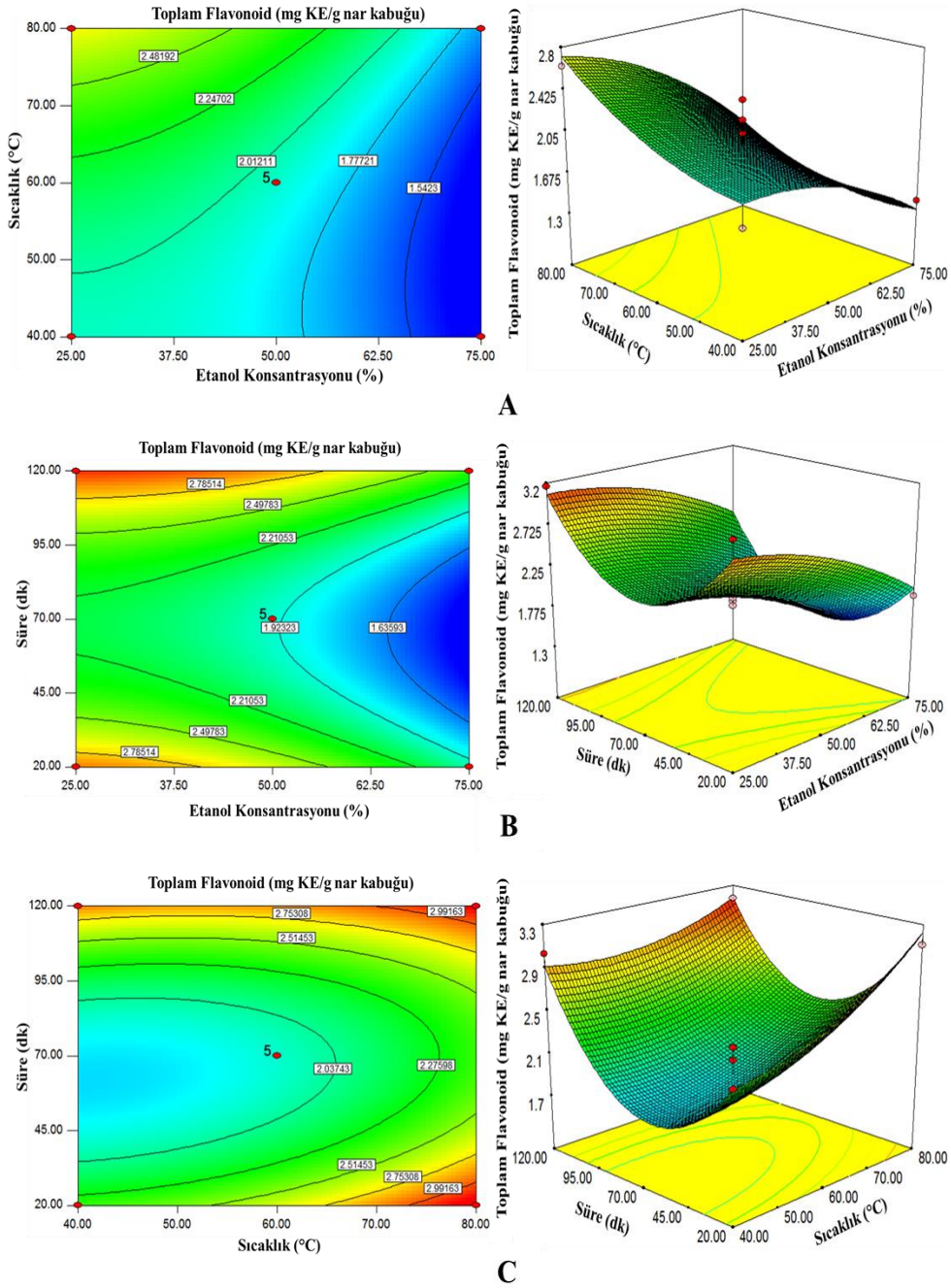
Table 6. Optimum conditions of the pomegranate peel extraction and total phenolic, flavonoid, antioxidant activity results of the pomegranate peel extract obtained under optimum conditions

Optimum koşulları <i>Optimum conditions</i>	Etanol (%)	33
	Sıcaklık (°C)	78
	Süre (dakika)	113
Optimum koşullarda program tarafından tahmin edilen toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları <i>Values estimated by the program at optimum conditions</i>	Tahmini Toplam Fenolik (mg GAE/g nar kabuğu)	280.00
	Tahmini Toplam Flavonoid (mg KE/g nar kabuğu)	3.16
Optimum koşullarda gerçekleştiren ekstraksiyon sonucu toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları <i>Values obtained at the end of the extraction at optimum conditions</i>	Toplam Fenolik (mg GAE/g nar kabuğu)	319.25±4.40
	Toplam Flavonoid (mg KE/g nar kabuğu)	3.27±0.04
Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktın antioksidan aktiviteleri <i>Values obtained at the end of the extraction at optimum conditions</i>	DPPH (µmol TE/L)	182.62±1.30
	FRAP (µmol TE/L)	1288.39±5.73
	TEAC (µmol TE/L)	305.92±7.23



Şekil 4. Nar kabuğundan fenolik bileşik ekstraksiyonu üzerine sıcaklık, zaman ve etanol konsantrasyonunun etkisini gösteren cevap yüzey grafikleri. A: 70 dakikada, sıcaklık ve etanol konsantrasyonunun fenolik madde üzerine etkisi. B: 60°C sıcaklıkta, etanol konsantrasyonu ve sürenin toplam fenolik madde üzerine etkisi. C: %50 etanol konsantrasyonunda sıcaklık ve sürenin fenolik madde üzerine etkisi.

Figure 4. The response surfaces plots showing the effect of temperature, time and ethanol concentration on the phenolic compound extraction from pomegranate peel. A: The effect of the temperature and the ethanol concentration on phenolic content for 70 minutes. B: The effect of the concentration of ethanol and time on total phenolic content at 60°C. C: The effect of the temperature and the time on total phenolic content at 50% ethanol concentration.



Şekil 5. Nar kabuğundan flavonoid bileşik ekstraksiyonu üzerine sıcaklık, süre ve konsantrasyonun etkisini gösteren cevap yüzey grafikleri. A: 70 dakikada, sıcaklık ve etanol konsantrasyonunun flavonoid madde üzerine etkisi. B: 60°C sıcaklıkta etanol konsantrasyonu ve sürenin toplam flavonoid madde üzerine etkisi. C: %50 etanol konsantrasyonunda sıcaklık ve sürenin flavonoid madde üzerine etkisi. *Figure 5. The response surfaces plots showing the effect of temperature, time and ethanol concentration on the flavonoid compound extraction from pomegranate peel. A: The effect of the temperature and the ethanol concentration on flavonoid content for 70 minutes. B: The effects of ethanol concentration and the time on total flavonoid content at 60°C. C: The effect of temperature and time on total flavonoid content at 50% ethanol concentration.*

Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteleri ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 6 ve Çizelge 7'de gösterilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri; DPPH: 182.62 µmol TE/L, FRAP: 1288.39 µmol TE/L ve TEAC: 305.92 µmol TE/L olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyel aktivite bakımından da nar kabuğu ekstraktı seçilen mikroorganizmaların gelişimini yüksek oranda engellemiştir (Çizelge 7). Ekstraktın antibakteriyel

etkinliği, Gram (+) bakteriler üzerinde daha duyarlı olduğu gözlemlenmişken, antifungal etki ise *A. niger*'e karşı daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 7). Çizelge 7'de optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktların MİK sonuçları, seçilen bakteriler ve küfler için disk difüzyon yönteminde bulunan sonuçlara paralel olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktlarda yüksek antioksidan aktivite gösteren ekstraktlar, yüksek antimikrobiyel aktivite göstermişlerdir.

Çizelge 7. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteleri

Table 7. Antimicrobial activities of extract obtained under optimum conditions against different microorganisms

		Nar Kabuğu <i>Pomegranate Peel</i>	Ampicillin <i>Ampicillin</i>
<i>S. aureus</i>	İnhibisyon zonu	20.00±0.00	26.00
	MİK (mg/mL)	3.75±0.00	0.48±0.00
	MBK (mg/mL)	3.75- Üreme yok	0.48- Üreme yok
<i>E. faecalis</i>	İnhibisyon zonu	16.00±0.71	24.00
	MİK (mg/mL)	3.75±0.00	0.48±0.00
	MBK (mg/mL)	3.75- Üreme yok	0.48- Üreme yok
<i>E. coli</i>	İnhibisyon zonu	14.50±0.71	23.50
	MİK (mg/mL)	7.50±0.00	0.96±0.00
	MBK (mg/mL)	7.50- Üreme yok	0.96- Üreme yok
<i>A. niger</i>	İnhibisyon zonu	18.00±0.71	25.50
	MİK (mg/mL)	3.75±0.00	0.96±0.00
	MBK (mg/mL)	3.75- Üreme yok	0.96- Üreme yok
<i>A. flavus</i>	İnhibisyon zonu	16.00±0.00	25.00
	MİK (mg/mL)	3.75±0.00	0.96±0.00
	MBK (mg/mL)	3.75- Üreme yok	0.96- Üreme yok

Disk Çapı:6mm, %33 etanol tüm mikroorganizmalar için 7 mm inhibisyon zonu vermiştir.

Optimum Koşullarda Elde Edilen Nar Kabuğu Ekstraktlarının Fenolik Bileşik Kompozisyonları

Optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktlarının fenolik bileşiklerinin tanımlanması HPLC ile yapılmış ve sonuçlar Çizelge 8'de sunulmuştur. Çizelge 8'de görüldüğü gibi, optimum koşullarda elde edilen nar kabuğu ekstraktlarında da 13 adet fenolik tanımlanmış ve nar kabuğu ekstraktlarının en fazla kuarsetin ve epikateşin içerdiği, bunu ferulik asit ve 2.4 hidroksibenzoik asitin izlediği görülmektedir

Bu çalışmada nar kabuğu ekstraktlarında gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin, elajik asit, ferulik asit, kuarsetin, kaempferolün yanında pirogallol, şiringik asit, 2.4 hidroksibenzoik asit, vanilik asit, rosmarinik asit ve naringenin tanımlanmış ve literature benzer sonuçlar elde edilmiştir (Seeram, 2005). Gil vd., (2000) tarafından yapılan araştırmada ise nar kabuğunun yüksek oranda elajik asit, gallik asit ve bu bileşiklerin izomerleri içerdiği ifade edilmiştir. Nar kabuğu ile ilgili yapılan bir çalışmada gallik asit (2.69 mg/g), punikalajin (64.98 mg/g), kateşin

(12.65 mg/g); klorojenik asit (0.35 mg/g); kafeik asit (0.02 mg/g); epikateşin (0.94 mg/g); rutin (0.36 mg/g) ve elajik asit (2.83 mg/g) tanımlanmıştır (Singh vd., 2002). Bu çalışmada elajik asit 0.84 mg/mg nar kabuğu, gallik asit ise 0.15 mg/mg nar kabuğu olarak bulunmuştur. HPLC kromatogramında yüksek oranda tanımlanamayan piklerin punikalajin ve türevlerine (α , β) ait olabileceği sonucuna varılmıştır (Türkyılmaz vd., 2017).

Çizelge 8. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktın fenolik bileşik içeriği

Table 8. Phenolic compound content of the extract obtained under optimum conditions

No	Fenolik Bileşik <i>Phenolic Compound</i>	Nar Kabuğu (mg/g nar kabuğu) <i>Pomegranate Peel</i> (mg/g pomegranate peel)
1	Gallik asit	0.15±0.00
2	Kafeik asit	0.56±0.00
3	Ferulik asit	1.10±0.01
4	Kateşin	0.34±0.00
5	2.4 hidroksibenzoik asit	1.04±0.01
6	Klorojenik asit	0.40±0.00
7	Elajik asit	0.84±0.01
8	Vanilik asit	0.88±0.01
9	Kuarsetin	1.32±0.01
10	Epikateşin	1.32±0.01
11	Kaempeferol	0.43±0.00
12	Rosmarinik asit	0.20±0.00
13	Naringenin	0.28±0.00

SONUÇ

Doğal olmayan antioksidan ve antimikrobiyel maddelerin vücutta oluşturdukları zararlardan dolayı sentetik maddelerin yerini alabilecek doğal koruyucu madde arayışlarını ve özellikle fenolik bileşikler üzerindeki araştırmaları hızlandırmıştır. Bu çalışmada nar (*P. granatum L.*) kabuklarından antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteye sahip yüksek oranda fenolik ve flavonoid eldesi için optimizasyon çalışmaları yapılmış ve optimum koşul olarak 78°C, %33 etanol konsantrasyonu, 113 dakika belirlenmiştir. Sonuç olarak nar kabuklarından elde edilen fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri ile sentetik antioksidanların

yerine, antimikrobiyel özellikleri ile patojen mikroorganizmaların gelişimini engellemede, yaşamın ilerleyen süreçlerinde oluşabilecek serbest radikaller ve bunların zararlı etkilerini önlemede ve bu şekilde insanların daha sağlıklı bir yaşam sürebilmesini sağlayabilecek potansiyellerinin olduğu ortaya konmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından V-056 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Amyrgialaki, E., Makris, D. P., Mauromoustakos, A., Kefalas, P. (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Ind Crops Pro*, 59, 216-222.

Anonim, 2016 <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/>

Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları, Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal Bioanal Chem*, 239, 70-76.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol Res*, 28, 25-30.

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2014). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74 (17), 2157-2184.

Ebrahimabadi, A. H., Bidgoli, Z., Mazoochi, A., Kashi, F. J., Batooli, H. (2010). Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the leaves and flowers of *Chaerophyllum macropodium* Boiss. *Food Control*, 21, 1173-1178.

- Farag, M. A., Al-Mahdy, D. A., Salah El Dine, R., Fahmy, S., Yassin, A., Porzel, A., Brandt, W. (2015). Structure activity relationships of antimicrobial gallic acid derivatives from pomegranate and acacia fruit extracts against potato bacterial wilt pathogen. *Chemistry & Biodiversity*, 12 (6), 955-962.
- Girgin, G., Başaran, N., Şahin, G. (2001). Dünyada ve Türkiye’de insan sağlığını tehdit eden mikotoksinler. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 58: 97-118.
- Jaiswal, V., DerMarderosian, A., Porter, J. R. (2010). Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chem*, 118(1), 11-16.
- Li, Y., Guo, C., J. Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem*, 96 (2), 254-260.
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *J Sci Food Agric*, 86 (13), 2046-2056.
- Nahar, P. P., Driscoll, M. V., Li, L., Slitt, A. L., Seeram, N. P. (2014). Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. *J Func Foods*, 6, 126-136.
- Oskay, M., Aktaş, K., Sarı, D., Azeri, C. (2007). *Asphodelus aestivus* (Liliaceae)’un antimikrobiyal etkisinin çukur ve disk diffüzyon yöntemiyle karşılaştırmalı olarak belirlenmesi. *Ekoloji Dergisi*, 16, 62-65.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G. G., McHugh, T. H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 1249-1257.
- Prakash, C.V.S., Prakash, I. (2011). Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel - a review. *Int J Res in Chem Environ*, 1 (1), 1-18.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
- Samaranayaka, A. G. P., Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Func Foods*, 3 (4), 229-254.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M., Niu, Y., Zhang, Y., Nair, M.G., Heber, D. (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem*, 16, 360-367.
- Singh, R.P., Chidambara-Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J Agric Food Chem*, 50 (1), 81-86.
- Singleton, V. L. ve Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, 16, 144-158.
- TUİK, (2017). T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu
<https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Türkyılmaz, M., Tağı, Ş., Özkan, M. (2017). Narın farklı bölümlerinin polifenol içeriği, antioksidan ve antibakteriyel aktivitesi üzerine ekstraksiyon çözümlerinin etkisi. *Akademik Gıda*, 15(2), 109-118.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chem*, 106 (2), 804-810.
- Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., Du, L. (2010). Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit, Vegetable Cereal Sci Biotechn*, 4 (2), 77-87.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64 (4), 555-559.

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Haruna Tela, A, Karatas, F, Saydam, S. *Comparison of vitamin, peptide and malondialdehyde content of different eggs* / Farklı yumurtaların vitamin, peptid ve malondialdehit içeriğinin karşılaştırılması216-225
- Güven, B., Duraklı Velioglu, S., Boyacı, I. H. *Rapid identification of some sweeteners and sugars by attenuated total reflectance-fourier transform infrared (ATR-FTIR), near-infrared (NIR) and Raman spectroscopy* / Bazı tatlandırıcı ve şekerlerin zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR), yakın kızılötesi (NIR) ve Raman spektroskopisi ile hızlı tanımlanması274-290
- Gülseren, İ., Çakır, B., Çağlar, A. F. *Preliminary investigations in vitro ace-inhibitory activities of tryptic peptides produced from cold press deoiled hazelnut meals* / Soğuk pres fındık posalarından üretilmiş triptik peptitlerin in vitro ace inhibe edici aktiviteleri üzerine ön incelemeler309-317
- Çalışkan Koç, G., Çabuk, B. *The effect of different microwave powers on the drying kinetics and powder properties of foam-mat dried egg white powder* / Farklı mikrodalga güçlerinin köpük kurutma yöntemi ile kurutulmuş yumurta beyazı tozlarının kuruma kinetiği ve toz ürün özellikleri üzerine etkisi.....328-339
- Uzunlu, S. *Assessment of some physicochemical and microbiological quality parameters of raw meatballs prepared with high pressurized meat* / Yüksek basınç uygulanan etle hazırlanan çiğ köftelerin bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalite parametrelerinin değerlendirilmesi.....340-347
- Atmaca, E. *Biomonitoring of some persistent organochlorine contaminants in the milk of Anatolian water buffaloes* / Anadolu mandası sütlerinde bazı kalıcı organik klorlu kirleticilerin biyoizlenmesi348-356

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Özpolat, E. Limon (*Citrus limon*) ve acı portakal (*Citrus aurantium*) uçucu yağlarının $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen Gökkuşuğu alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) mikrobiyolojik kalitesi üzerine etkileri / *Effects of lemon (Citrus limon) and bitter orange (Citrus aurantium) essential oils on microbiological quality of stored at $4\pm 1^\circ\text{C}$ rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*185-190
- Alp, D., Kuleşan, H. Farklı kaynaklardan izole edilmiş laktik asit bakterilerinin ekzopolisakkarit üretimi ve kolesterol asimilasyon yeteneklerinin belirlenmesi / *Determination of exopolysaccharide production and cholesterol assimilation abilities of lactic acid bacteria isolated from different sources*191-201
- Uçak, İ. Taze karideslerin raf ömrünün uzatılmasında soğan kabuğu ekstraktının etkisi / *The effects of onion peel extract in preventing shelf life of fresh shrimp*.....226-237
- Erginkaya, Z., Sankodal, E., Özkütük, S. T., Konuray, G., Ünal Turhan, E. Probiyotik bitter çikolata üretiminde mikroenkapsüle *Lactobacillus rhamnosus* kullanımı / *The use of microencapsulated Lactobacillus rhamnosus in probiotic bitter chocolate production*238-247
- Bulut Ergin, D., Koca, N. Toprağa gömerek veya buzdolabı koşullarında olgunlaştırmanın Sivas küp peynirinin özellikleri üzerine etkisi / *The effects of ripening of Sivas küp (jar) cheese storing under refrigerated conditions or being buried in the soil*248-259
- Atıl, Ö., Gülsünoğlu, Z., Kılıç Akyılmaz, M. Depo bağıl nemi ve sıcaklığının saray helvasının kalitesine etkileri / *Effects of storage relative humidity and temperature on quality of palace halva*260-273
- Bostancı, C., Ertuğrul Karatay, S., Dönmez, G. Yer fıstığı kabuğundan biyoetanöl üretimi / Bioethanol production from peanut shell291-300
- Güven, G. Aydın ilinde tüketilen sebze ve meyvelerin eser element derişimlerinin tayini / *Determination of trace element concentrations of vegetables and fruits consumed in Aydın province*301-308
- Şimşek, A. Kırmızı pancar (*Beta vulgaris L.*) betalainleri üzerine termal destekli ultrasonik ekstraksiyonun etkisi / *The effect of thermal assisted ultrasonic extraction on the red beetroot (Beta vulgaris L.) betalains*318-327
- Yılmaz, F. M., Yıldırım, E., Karakuş, M. Doğal renk maddesi katkılı sert şekerleme üretimi: farklı karbonhidrat formülasyonlarının renk, camsı geçiş, higroskopite, karbonhidrat kompozisyonu ve duysal özellikler üzerine etkileri / *Production of natural colorant fortified hard candy: Effects of different carbohydrate formulations on colour, glass transition, hygroscopicity, carbohydrate composition and sensory properties*357-368
- Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., Güngör, H. Nar kabuğundan antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu / *Optimization of the extraction conditions of phenolic compounds with antimicrobial and antioxidant activity from pomegranate peel*369-382

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Bilecen Şen, D., Kılıç, B., Demir, E., Başyigit Kılıç, G. Et ve et ürünlerinde mikrobiyal dekontaminasyon için bazı ısıl olmayan teknolojilerin kullanımı / *Applications of some non-thermal technologies for microbial decontamination in meat and meat products*202-215