

GIDA



THE JOURNAL OF FOOD

E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 44

SAYI / NUMBER : 4

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: 4 • 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@gidadernegi.org URL: http://www.gidadernegi.org</p> <p>Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli</p> <p>Hazırlayan/ Prepared Onay Ofset Matbaacılık G.M.K. Bulvarı No: 108/1 Maltepe / Ankara Turkey</p> <p>Tel: (+90) 312 230 22 09 e-mail: onayofset@gmail.com</p> <p>Yayın Tarihi/ Publication Date 15 08 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 Ataturk 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 (Sciindex), Scientific Indexing Services (SIS), CABI (CAB Direct), Academic Resource Index, IJIF, Food Science and Technology Abstracts (FSTA) ve Google Scholar veri tabanları kapsamındadır.

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

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Yüksel, M., Sert, S., Çetin, B. *Determination of microbiological quality and presence of Salmonella spp. on chicken parts sold at retail markets in Erzurum, antibiotic resistance of the Salmonella spp. isolates* / Erzurum'da satışa sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik kalitesi ve Salmonella spp. varlığının belirlenmesi, Salmonella spp. izolatların antibiyotik direnci **553-562**
- Gidado Mukhtar, Z., Salihu Ibrahim, M., Ibrahim Ibrahim, Y., Karatas, F. *Amounts of vitamin A, vitamin E, vitamin C, β -carotene, lycopene, ghrelin, glutathione, and MDA in fruits of Diospyros kaki L.* / Trabzon hurması (*Diospyros kaki L.*) meyvelerindeki A vitamini, E vitamini, C vitamini, β -karoten, likopen, grelin, glutasyon ve MDA miktarları **585-592**
- Hepsağ, F. *Determination of total phenolic compounds and antioxidant capacity of Anzer honey produced in Rize, Turkey* / Rize'deki Anzer yaylası'nın endemik çiçeklerinden üretilen anzer balının toplam fenolik bileşiklerinin ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi **641-653**
- Dirim, S. N., Talih, M., Çalışkan Koç, G. *Dying characteristics of red beet (Beta vulgaris esculentacruenta) puree in a microwave oven* / Kırmızı pancar püresinin (*Beta vulgaris esculentacruenta*) mikrodalga fırında kuruma kinetiği **654-671**
- Cüce, M. *Determination of aflatoxin contents of Şebinkarahisar walnut variety by ELISA method* / Şebinkarahisar ceviz çeşidinde aflatoxin içeriğinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi **672-680**
- Topalcengiz, Z., Işık, S., Işık, H., Güner, S. *Survival of acid adapted and non-adapted stationary phase Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in pomegranate juice* / Aside adapte ve adapte olmayan durağan faz Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium ve *Listeria monocytogenes* in nar suyundaki canlı kalma sürelerinin belirlenmesi **681-691**

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Turan, A., İslam, A. *Tombul fındık çeşidinde yağ oksidasyonunu azaltacak kurutma yönteminin belirlenmesi / Determination of drying method for reducing oil oxidation of Tombul (cv) hazelnut* **563-575**
- Aydemir, O. *Yeni bir ürün-kakaolu kestane kreması üretiminde kavurma sıcaklığının etkisi / The effect of roasting temperature in production of cocoa chestnut cream-a new product* **576-584**
- Gençdağ, E., Görgüç, A., Birişik, M., Genç, E., Başkurt, C., Yılmaz, F. M. *Kırmızı pancar suyu üretiminde enzim ön uygulaması: işlem koşullarının meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerine etkisi / Enzymatic pre-treatment in red beet juice production: the effect of process variables on juice yield, betanine content, total phenolic compound and antioxidant capacity* **593-604**
- Yıldız Turgut, D., Çınar, O., Seçmen, T. *Farklı yöntemlerle elde edilen kamkat (Fortunella margarita swing.) tozlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi / Determination of functional properties of kumquat (Fortunella margarita swing.) powders obtained by different methods* **605-617**
- Severcan, S. S., Uzal, N., Kahraman, K. *PSF/SiO₂ nanokompozit membran üretimi ve elma suyu berraklaştırma prosesinde kullanımı / Fabrication of PSF/SiO₂ nanocomposite membrane and application in apple juice clarification process* **618-628**
- İncegül, Y., Çam, M. *Adaçayı uçucu yağ eldesinden sonra arta kalan ürünlerin biyoaktif potansiyellerinin belirlenmesi / Determination of the bioactive potentials of sage (Salvia officinalis L.) by product after removal of essential oil* ... **629-640**
- Uçan Türkmen, F., Bingöl, B. N., Şahin, E., Özkarman, F., Tekin, Z. Erik (*Prunus domestica*) bazlı karışık meyveli geleneksel marmelat üretimi / *Production of tradational marmalade with mixed fruit based plum (Prunus domestica)* ... **707-718**
- Ephrem Adifon, D., Tuncer, Y. *Peynirden izole edilen yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokoklarda virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması / Investigation of virulence factors using phenotypic and genotypic methods in high-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from cheese* **719-732**
- Cumhur, Ö. *Geleneksel gıdalardan Dartı'nın üretim yöntemi ve bazı özelliklerinin belirlenmesi / Determination of production method and some characteristics of Dartı from traditional foods* **734-741**
- Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. *Seçilmiş endojen laktik starter kültürler ile turşu üretimi / Pickle production by selected indigenous lactic starter cultures* **742-757**

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Emenli, İ., Tiryaki Gündüz, G. *Gıdalarda bulunan küflerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler / Methods for identification of molds in foods* **692-706**

DETERMINATION OF MICROBIOLOGICAL QUALITY AND PRESENCE OF *SALMONELLA* SPP. ON CHICKEN PARTS SOLD AT RETAIL MARKETS IN ERZURUM, ANTIBIOTIC RESISTANCE OF THE *SALMONELLA* SPP. ISOLATES

Mehmet Yüksel^{1*}, Selahattin Sert², Bülent Çetin²

¹Atatürk University, Hınıs Vocational Training School, Department of Food Processing, Hınıs, Erzurum, Turkey

²Atatürk University, Faculty of Agriculture, Department of Food Engineering, Erzurum, Turkey

Received / Geliş: 08.08.2018; Accepted / Kabul: 30.05.2019; Published online / Online baskı: 02.07.2019

Yüksel, M., Çetin, B., Sert, S. (2019). Determination of microbiological quality and presence of *Salmonella* spp. on chicken parts sold at retail markets in Erzurum, antibiotic resistance of the *Salmonella* spp. isolates. *GIDA* (2019) 44 (4): 553-562 doi: 10.15237/gida.GD18086

Yüksel, M., Çetin, B., Sert, S. (2019). Erzurum'da satışa sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik kalitesi ve *Salmonella* spp. varlığının belirlenmesi, *Salmonella* spp. izolatların antibiyotik direnci. *GIDA* (2019) 44 (4): 553-562 doi: 10.15237/gida.GD18086

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the certain microbiological quality characteristics, and presence of *Salmonella* spp. by immunomagnetic separation (IMS) and conventional method, also to evaluate the antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolates obtained from 45 chicken meat samples (fifteen livers, chests, baguettes) collected from markets at the Erzurum. Totally, in the 15 samples were found positive for *Salmonella* spp. by IMS and conventional methods. Isolates were identified with 99.9% probability using API 20E biochemical analysis kit. The results of antibiotic test showed the susceptibility of the isolates to ciprofloxacin, chloramphenicol and gentamicin at 100% level, while these isolates were resistance to tetracycline, trimethoprim, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, streptomycin, ampicillin and kanamycin, respectively. The obtained results showed that 84% (38/45) of the chicken meat samples did not show suitability with Turkish Food Codex in terms of total bacteria count and presence of *Salmonella* in 33% (15/45) of the samples.

Keywords: Chicken meats, microbiological quality, *Salmonella* spp., immunomagnetic separation (IMS), antibiotic resistance

ERZURUM'DA SATIŞA SUNULAN TAVUK ETLERİNİN MİKROBİYOLOJİK KALİTESİ VE *SALMONELLA* SPP. VARLIĞININ BELİRLENMESİ, *SALMONELLA* SPP. İZOLATLARIN ANTİBİYOTİK DİRENCİ

ÖZ

Bu çalışma, Erzurum'da marketlerden toplanan 45 adet tavuk eti örneğinde (15'er ciğer, göğüs, bagnet) belirli mikrobiyolojik kalite karakteristikleri, immunomanyetik separasyon (IMS) ve geleneksel yöntem ile *Salmonella* spp. varlığını araştırmak için yapılmıştır. Ayrıca, *Salmonella* spp. izolatlarının antibiyotik dirençleri değerlendirilmiştir. Toplamda 15 örnekte IMS ve geleneksel metot ile *Salmonella* spp. pozitif bulunmuştur. Bu izolatlar API 20E biyokimyasal analiz kiti kullanılarak %99,9 ihtimalle doğrulanmıştır. *Salmonella* spp. izolatları siprofloksasin, kloromfenikol ve gentamisin antibiyotiklerine karşı %100 seviyesinde duyarlılık gösterirken, sırasıyla tetrasiklin, trimetoprim, sülfametoksazol/trimetoprim, nalidiksik asit, streptomisin, ampisilin ve kanamisin antibiyotiklerine karşı direnç göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre tavuk etlerinin %84'ü (38/45) toplam bakteri sayısı, %33'ünün (15/45) *Salmonella* spp. varlığı açısından Türk Gıda Kodeksi'ne uygun olmadığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Tavuk etleri, mikrobiyolojik kalite, *Salmonella* spp., immunomanyetik separasyon, antibiyotik direnç

* Corresponding author/ Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ mehmet.yuksel@atauni.edu.tr

☎ (+90) 442 511 2815

☎ (+90) 442 511 2896

INTRODUCTION

Chicken meats can be contaminated with certain pathogen bacteria and various microorganisms. Raw chicken meats may harbour many important pathogenic microbes i.e. *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *S. aureus* and *Listeria monocytogenes*, causing risks in meat products for human health, under the poor hygiene conditions (Sharma & Chattopadhyay, 2015). Among these microorganisms, *Salmonella* spp. is the major agent. Transmission of many potential microorganisms may occur during the processing of chicken. For that reason, chicken meats can be thought as one of the major food vehicles for this pathogen. Improper processing conditions can cause cross contamination from beforehand handled raw chicken carcasses and parts to cooked chicken meats. Consumption of contaminated raw or undercooked poultry products (particularly chicken meat) is the primary reason of *Salmonella* infections in humans (Bryan & Doyle, 1995; Çetin, 2006; Park et al., 2014).

Salmonella is the most frequently reported pathogen among causative agents of foodborne diseases worldwide. Moreover, antimicrobial resistance can be considered as a growing problem in terms of poultry-associated pathogens. As a result of using antibiotics for therapeutic, prophylactic and non-therapeutic objectives in commercial poultry meat production, antibiotic-resistant and multi-drug resistant strains of *Salmonella* can be found in the final product. The emergence of antibiotic resistance of bacterial agents has become a major public health concern (Salihu et al., 2014; Sapkota et al., 2014; Gurler et al., 2015).

Ensuring the safety of poultry meats by early detection of foodborne pathogens would be regarded as a main factor in preventing *Salmonella* contamination. The controlling of poultry and other related products for *Salmonella* contamination can be made particularly more efficient by using quick and sensible determination methods (Park et al., 2014).

In immunomagnetic separation (IMS) system, superparamagnetic beads coated with antibodies

are used against surface antigens of the cells for the efficient isolation of target bacteria. Isolation of target pathogen bound to the beads with the antigen-antibody interaction can be determined by transferring the inoculated bead samples to culture broths or selective agar for the microorganism. Immunomagnetic separation (IMS) is successfully used to step-down the enrichment stage for reducing the total analysis as much as 24 h. In this method, super paramagnetic beads or polystyrene particles are used as coated with iron oxides or oxide-hydroxides. The antibodies allow for the specific holding and isolation of pathogen microorganisms from the present microflora of food samples (Taban & Ayaç, 2009; Foddai et al., 2010; Wadud et al., 2010; Chakraborty et al., 2011).

The aim of this research was to evaluate the changes in certain microbiological properties (total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), coliform bacteria, psychrotrophic bacteria, yeast-mould and *Enterococcus* spp.) and the presence of *Salmonella* spp. in different parts of chicken (liver, chest and baguette) obtained from markets in the Erzurum. For the determination of the *Salmonella* existence in the chicken meats by conventional and IMS methods., Another aim of the study is to show the antibiotic susceptibility and resistance of identified *Salmonella* spp. isolates against 10 different types of antibiotic.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Totally 45 fresh chicken meat samples (15 livers, 15 chests and 15 baguettes,) were taken from different markets and butcher shops in the Erzurum. The samples were immediately transported to laboratory under cold conditions and kept at 4°C for maximum 1 h before analysis.

General microbiological analysis

For liver and chest samples, 25 g were weighted and diluted aseptically in 225 mL sterile maximum recovery diluent (MRD) (0.85% NaCl+0.1% peptone) and homogenised in filtered polyethylene bag using a Stomacher (Seward Laboratory Blender Stomacher 400 Lab Blender, UK) for 5 min. However, one baguette was used

for each sample and rinsed for 2 min in a sterile filter stomacher bag containing 500 mL sterile MRD. Then serial decimal dilutions of homogenates were prepared and plated on specific media. Total aerobic mesophilic bacteria count were determined on Plate Count Agar (PCA) (Merck, Darmstadt, Germany) at $30\pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h (Harrigan, 1998; Maturin & Peeler, 1998; ISO, 2013). Total coliform counts were determined using Violet Red Bile Agar (VRB) (Merck, Darmstadt, Germany) at $37\pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h (Harrigan, 1998; ISO, 2006). The counts of psychotropic bacteria were enumerated on PCA at $7-10\pm 1^\circ\text{C}$ for 10 days (ISO, 2001), and yeast-moulds were determined on Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany) acidified with 10% lactic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at $25\pm 1^\circ\text{C}$ for 5-7 days (Koburger & Marth, 1984; ISO, 2008). Selective enumeration and detection of *Enterococcus* spp. were performed on Kanamycin Aesculin Azide Agar (KEAA) (Oxoid, Hampshire, UK). The plates of *Enterococcus* spp. cultures were incubated under aerobic conditions at $35-37\pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h (Harrigan, 1998; ISO, 2000; Sanlibaba et al., 2018).

Bacterial strain

Salmonella Typhimurium RSSK 95091 were supplied by the Refik Saydam Hıfzıssıhha Culture Collection (Turkey).

Isolation and Identification Protocols of *Salmonella*

Samples were analysed according to ISO 6579-1:2017 (Microbiology of the food chain-horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*-part 1: detection of *Salmonella* spp.) for the detection of *Salmonella* (Yüksel Kavaz & Yüksel, 2015; ISO, 2017). For each chicken liver and chest sample, 25 g was pre-enriched in 225 mL Buffered Peptone Water (Oxoid, Hampshire, UK) at 37°C for 24 h. Chicken baguettes were rinsed for 2 min in a sterile filter stomacher bag containing 500 mL sterile distilled water and then 25 mL was pre-enriched in 225 mL Buffered Peptone Water. Afterwards, 0.1 mL of pre-enrichment samples were transferred in 9.9 mL of Rappaport-

Vassiliadis (RVS) Enrichment Broth (Oxoid, Hampshire, UK) and 1 ml in 9 ml of Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocine enrichment broth (MKTTn) (Merck, Darmstadt, Germany) and tubes were incubated at $42\pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h for RVS, at $37\pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h for MKTTn, respectively. After overnight incubation, a loopful of the enrichment samples was streaked onto Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) (Merck, Darmstadt, Germany) and Xylose Lysine Tergitol-4 Agar Base (XLT4) (Merck, Darmstadt, Germany). Both selective agar media were incubated for 24 h at 37°C

IMS was performed according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, California, USA). Twenty micro liter for *Salmonella* spp. Dynabeads anti-*Salmonella* (Invitrogen, California, USA) were incubated with 1 mL of the pre-enriched BPW of each sample in 2 mL micro-centrifuge tube at room temperature for 15 min with repeated rocking, so that the specific antibodies coated on to the beads would bind *Salmonella*. The bead-bacteria complex were subsequently separated using a magnetic particle collector (Dynamag; Invitrogen, California, USA). Afterwards, 1 mL of washing buffer (PBS (Oxoid, Hampshire, UK), and 0.05% Tween 20 (Merck, Darmstadt, Germany) was added to resuspend the beads and were washed three times with PBS (pH 7.4) solution. Finally, 200 μL of washing buffer was added to resuspend the beads. Afterwards, equally 100 μL of the complex was plated onto XLD and XLT4 Agar. The selective agars media were incubated for 24 h at 37°C .

Identification

After isolation of *Salmonella* by both IMS and conventional method, suspicious colonies were tested by Gram staining and oxidase reaction. Both Gram-negative and Oxidase-negative isolates were further tested. Then, isolated colonies were transferred to tubes with Triple Sugar Iron agar (Oxoid, Hampshire, UK) and Lysine Iron agar (Oxoid, Hampshire, UK), and incubated at $35-37^\circ\text{C}$ for 18-24 h. Additional biochemical tests were performed by using API 20E test kit (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The plastic strips holding twenty mini-test tubes

were inoculated with the saline suspensions of the cultures according to manufacturer's directions. After incubation in a humidity chamber for 18-24 hours at 37°C, the colour reactions were read (some with the aid of added reagents as supplied by the kit). The data were analysed by the manufacturer's software (apiweb) and positive results with $\geq 99.9\%$ probabilities were confirmed as *Salmonella* spp.

Antibiotic resistance testing

The antibiotic resistance profiles of isolated *Salmonella* spp. were determined with Kirby-Bauer Disk diffusion protocol recommended as the standard of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2014). A loopfull of each pure bacterial isolate was emulsified in 5 mL of sterile 0.85% NaCl solutions, and the density was compared with a barium chloride (BaCl₂) standard (0.5 McFarland). A sterile cotton swab was dipped into the standardized suspension of bacterial cultures and used to evenly inoculate the Mueller-Hinton Agar plates (Oxoid, Hampshire, UK), and the plates were allowed to dry. Antibiotic discs with the following drug contents ciprofloxacin (CIP, 5 µg), sulfamethox/trimethoprim (SXT, 5 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), streptomycin (S, 10 µg), ampicillin (AMP, 10 µg), gentamicin (CN, 10 µg), kanamycin (K, 30 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), trimethoprim (W, 5 µg) and tetracycline (TE, 30 µg) (supplied by Oxoid, Hampshire, UK) were placed at least 15 mm apart and from the edge of the plates to prevent the overlapping of the inhibition zones. Plates were incubated at 37°C for 24 h, and the diameters of zones of inhibition were measured with a ruler. The sizes of the inhibition zones allowed the strains to be classified as susceptible and resistant according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Storage of the isolates

Positive colonies were streaked onto Nutrient Agar (NA) and incubated overnight at 37°C. A generous colony swab was collected from each NA plate and stored at -80°C in with 15% glycerol.

RESULTS AND DISCUSSION

General microbiological quality characteristics of chicken meat samples

The general microbiological composition of chicken meat samples and mean values are shown in Table 1 (Log CFU/g).

Observing the certain microbiological quality characteristics of chicken meat samples, the lowest mean counts of TAMB and coliform bacteria were found in L14 sample. The highest mean values of TAMB count were determined in B12 sample, while the highest coliform bacteria were detected in sample B15 (Table 1). Similar TAMB results were also reported by Çetin (2006). As seen in Table 1, the mean psychrotrophic bacteria counts of chicken meats were between 5.00 Log CFU/g (Sample C7) to 8.67 Log CFU/g (Sample B9). Similar findings were reported by Çetin (2006). The highest yeast and mould counts were determined in sample B9, while the lowest mean value was in sample L11. Çetin (2006) reported that the number of yeast and mould of the observed chicken meats was found as 5-6 Log CFU/g. *Enterococcus* spp. was not determined in 10 liver samples (Samples L1, L3, L5, L6, L7, L8, L10, L11, L13, L15), 9 chest samples (Samples C1, C2, C3, C5, C7, C8, C11, C12, C14) and 8 baguette samples (B1, B3, B6, B9, B11, B12, B14 and B15). Based on these results, it might be said that baguette samples had highest microbiological load in terms of investigated microorganisms, followed by liver and chest samples. According to the Turkish Food Codex it is allowed to have raw poultry meat less than 5.0 Log CFU/g of total aerobic mesophilic bacteria (Anonymous, 2009). The obtained results showed that 84% (38/45) of the observed chicken meat samples did not show suitability with these standards in terms of TAMB count and similarly, 33% (15/45) of the samples was not suitable with respect to the presence of *Salmonella*. High microbiological counts in the samples is thought to be stemmed from the process of cutting, plucking, washing, cooling, freezing and storage.

Some microbiological quality parameters on chicken parts sold in Erzurum

Table 1. The certain viable bacteria counts of the chicken meat samples (Log CFU/g)

Samples	TAMB count	Coliform bacteria	Psychrotrophic bacteria count	Yeast-Mould	<i>Enterococcus</i> spp.
LIVERS (Log CFU/g)					
L1	7.69	3.39	6.04	6.17	<10
L2	7.47	3.54	5.60	6.30	2.47
L3	7.00	3.30	6.77	6.39	<10
L4	7.47	3.20	5.69	6.54	2.60
L5	6.85	2.47	6.34	6.00	<10
L6	7.54	3.00	6.84	5.95	<10
L7	7.00	4.12	6.91	6.17	<10
L8	6.45	3.26	5.74	6.23	<10
L9	7.30	3.55	6.52	6.74	3.00
L10	7.54	3.00	6.60	6.23	<10
L11	7.35	3.12	5.84	5.50	<10
L12	6.35	2.78	6.12	6.12	2.55
L13	7.00	2.84	5.32	5.45	<10
L14	5.85	2.25	6.53	6.45	2.20
L15	7.54	3.10	5.91	5.92	<10
CHESTS					
C1	7.01	3.23	6.35	6.49	<10
C2	7.44	3.11	6.83	6.46	<10
C3	7.45	3.27	5.65	5.95	<10
C4	6.35	2.90	6.68	6.45	2.74
C5	7.39	3.20	6.42	6.50	<10
C6	7.43	3.39	6.32	6.29	2.69
C7	6.85	3.22	5.00	6.10	<10
C8	5.95	3.10	5.24	6.23	<10
C9	7.32	3.47	6.10	6.78	2.84
C10	6.86	2.90	6.51	6.12	2.20
C11	6.40	2.65	6.55	5.90	<10
C12	7.40	3.25	6.32	6.46	<10
C13	7.21	3.10	6.65	6.19	2.00
C14	6.35	3.45	5.95	6.43	<10
C15	7.30	3.85	5.35	6.62	2.92
BAGUETTE					
B1	7.70	5.69	8.47	7.47	<10
B2	8.81	5.25	8.27	7.30	4.88
B3	7.60	5.55	8.43	7.55	<10
B4	8.76	5.61	8.14	6.51	4.94
B5	8.96	5.74	7.80	7.64	4.74
B6	7.43	5.87	8.34	7.01	<10
B7	8.45	4.81	8.14	7.30	3.98
B8	7.69	5.94	7.92	7.48	4.20
B9	9.01	5.67	8.67	7.69	<10
B10	8.85	5.32	8.32	7.64	4.58
B11	8.92	5.78	8.20	6.65	<10
B12	9.60	5.81	7.92	7.10	<10
B13	8.54	5.98	8.55	7.50	4.87
B14	7.12	5.67	7.44	7.30	<10
B15	9.01	6.00	8.12	6.40	<10

The suspicious *Salmonella* spp. colonies were identified with API 20E at the probability of 99.9%. Consequently, the results demonstrated that conventional and IMS methods showed similarity approximately with regard to the identification of *Salmonella* spp. in chicken meat samples.

The 15 chicken meat samples were found positive in terms of *Salmonella* by conventional method, while 13 the samples were determined as positive by IMS method (Table 2). *Salmonella* spp. were found positive in two samples by conventional method but could not be detect by IMS. The presence of *Salmonella* spp. in raw chicken livers, chests and baguettes were at the level of 27%, 33% and 40%, respectively. The chicken baguette was found higher microbial load than chest and liver. The presence of *Salmonella* spp. in investigated chicken meat samples might stem from the unhygienic conditions (Çetin, 2006; Procura et al., 2017; Zwe et al., 2018). Relatively inferior hygiene practices, such as cutting chickens with knife and chopping board without proper cleaning, and exhibiting chicken carcasses in the chillers without physical separation or individual packaging could likely contribute to cross-contamination events leading to a significantly higher rate of *Salmonella* spp. contamination in chicken meats sold in markets of Erzurum.

Table 2. Distribution of IMS with conventional methodology for *Salmonella* spp. detection in chicken meats.

	Conventional	IMS
n/N	15/45	13/45
%	33	28

(n: *Salmonella* positive sample number; N: Total sample number)

Recently, various researches have been focused on the presence of *Salmonella* spp. in poultry meat (Van et al., 2007; Pointon et al., 2008; Yang et al., 2011; Zwe et al., 2018). This study has shown the high of *Salmonella* contamination (33.3%) in chicken meats. Our results are similar to those

reported by Iseri and Erol (2010) 45.8% of turkey meat samples were showed to be contaminated with *Salmonella*. Also, this *Salmonella* prevalence rate of 33.3 % in raw chicken in Erzurum is similar compared to values reported in Anatolia (Yildirim et al., 2011). The presence of *Salmonella* from chicken meats found in this study was different that in previous works (Uyttendaele et al., 1999; Chung et al., 2003; Angkitittrakul et al., 2005; Van et al., 2007; Pointon et al., 2008; Hyeon et al., 2011; Yang et al., 2011). We assert that the difference of *Salmonella* prevalence between reports might be related with hygiene conditions. The unhygienic and improper processing methods might be the causes for higher incidence of salmonellosis (Ramya et al., 2012).

Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. isolates

For the determination of antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. isolates, 10 different antibiotics were used (Table 3 and Table 4). As seen in the Table 3, none of the *Salmonella* spp. isolates were resistant to CIP, C and CN, while resistance of isolates changed, as 10 of them to S, 12 of them to AMP, 5 of them NA and SXT, 3 of them to W and 2 of them to TE, respectively. Among the tested antibiotics, K and S had the highest effect on *Salmonella* spp. isolates and it was followed by AMP, NA, SXT, W, TE, CIP, C and CN, respectively. According to statistical evaluations, all samples showed statistical differences ($P < 0.01$) in terms of antibiotic resistances and susceptibilities (Table 4). These findings are in agreement with previous studies on chicken meat from Iran (Dallal et al., 2010; Sodagari et al., 2015), India (Mir et al., 2015), Turkey (Yildirim et al., 2011) and Egypt (Abd-Elghany et al., 2015), Iraq (Harb et al., 2018).

The results showed that 100% of the isolates were susceptible to CIP, C and CN, while 93.7% of them showed resistance to S and K.

In this research, 45 chicken meat samples (15 livers, 15 chests and 15 baguettes) were analysed with respect to certain microbiological parameters and presence of *Salmonella* spp. The obtained results showed that 84% (38/45) of the observed

Some microbiological quality parameters on chicken parts sold in Erzurum

chicken meat samples were not suitable according to the standards with respect to TAMC count and presence of *Salmonella* spp. (33%). In light of the obtained data, baguette samples were found higher microbial load than liver and chest samples in terms of analysed parameters. Then, suspicious colonies of *Salmonella* were confirmed as *Salmonella* spp. at the level of 99.9% confidence interval by API 20E test kit and conventional biochemical tests.

The obtained findings showed that conventional and IMS methods demonstrated similar properties in terms of the determination of *Salmonella* spp. from observed samples. In conclusion, combination of IMS and conventional methods could be used more effectively for the *Salmonella* isolation from foods than their single usage. Consequently, the identified *Salmonella* spp. isolates (15 isolates) were evaluated in terms of antibiotic resistance and susceptibility. The results showed that all

Salmonella spp. isolated from chicken meat samples had multi drug resistance.

Table 3. Antibiotic susceptibility of the obtained *Salmonella* spp. isolates (n:15)

Antibiotic	Susceptible	
	%	Number of <i>Salmonella</i> isolates
Ciprofloxacin (CIP)	100	15
Sulphamethoxazole/ Trimethoprim (SXT)	66.6	10
Chloramphenicol (C)	100	15
Streptomycin (S)	33.3	5
Ampicillin (AMP)	26.6	4
Gentamicin (CN)	100	15
Kanamycin (K)	6.6	1
Nalidixic Acid (NA)	66.6	10
Trimethoprim (W)	80.0	12
Tetracycline (TE)	86.6	13

n: *Salmonella* positive sample number

Table 4. The antimicrobial effects of different antibiotics on the *Salmonella* spp. isolated from the samples Antibiotics (Zone Diameter, mm)

Samples*	(CIP)	(SXT)	(C)	(S)	(AMP)
Control*	29.25±0.35 ^{Af}	31.25±0.35 ^{Ade}	30.10±0.14 ^{Bfe}	30.50±0.71 ^{Ade}	30.25±0.35 ^{Bc}
L1	24.00±0.00 ^{Dg}	25.10±0.14 ^{Df}	26.15±0.21 ^{De}	25.00±0.00 ^{Cf}	27.10±0.14 ^{Cdc}
L2	25.10±0.14 ^{Cg}	30.25±0.35 ^{Bb}	27.25±0.35 ^{Ce}	24.10±0.14 ^{Dh}	31.25±0.35 ^{Aa}
L3	0.00±0.00 ^{Gf}	0.00±0.00 ^{Gf}	0.00±0.00 ^{Hf}	0.00±0.00 ^{Ff}	0.00±0.00 ^{Df}
L7	0.00±0.00 ^G	0.00±0.00 ^{Ge}	0.00±0.00 ^{He}	0.00±0.00 ^{Fe}	0.00±0.00 ^{De}
C1	20.00±0.00 ^{Ffg}	19.50±0.71 ^{Fg}	20.00±0.00 ^{Gfg}	20.20±0.28 ^{Eefg}	20.50±0.71 ^{Cdef}
C3	0.00±0.00 ^{Gb}	0.00±0.00 ^{Gb}	0.00±0.00 ^{Hb}	0.00±0.00 ^{Fb}	0.00±0.00 ^{Db}
C6	22.00±0.00 ^{Ee}	26.25±0.35 ^{Cb}	25.35±0.49 ^{Ec}	24.25±0.35 ^{Dd}	25.25±0.35 ^{Dc}
C9	27.25±0.35 ^{Bd}	30.25±0.35 ^{Bb}	32.00±0.00 ^{Aa}	30.25±0.35 ^{Ab}	30.25±0.35 ^{Bb}
C15	20.25±0.35 ^{Ff}	24.10±0.14 ^{Ec}	24.40±0.57 ^{Fc}	27.10±0.14 ^{Ba}	27.39±0.16 ^{Ca}
B5	30.25±0.35 ^{Ae}	26.75±0.35 ^{Cd}	24.85±0.21 ^{Dg}	0.00±0.00 ^{Ff}	0.00±0.00 ^{Fe}
B6	31.75±0.35 ^{Ac}	26.20±0.28 ^{Ce}	26.00±0.00 ^{Cf}	0.00±0.00 ^{Ff}	0.00±0.00 ^{Fe}
B8	25.25±0.35 ^{Ah}	0.00±0.00 ^{Eh}	25.00±0.00 ^{Ag}	11.25±0.35 ^{Cd}	25.20±0.28 ^{Ab}
B11	30.00±0.00 ^{Afe}	28.25±0.35 ^{Bb}	26.25±0.35 ^{Cf}	0.00±0.00 ^{Gf}	0.00±0.00 ^{Ge}
B12	24.25±0.35 ^{Bi}	0.00±0.00 ^{Eh}	28.25±0.35 ^{Ad}	12.25±0.35 ^{Dc}	19.75±0.35 ^{Cc}
B15	34.25±0.35 ^{Ab}	27.25±0.35 ^{Cc}	30.25±0.35 ^{Bb}	0.00±0.00 ^{Gf}	0.00±0.00 ^{Ge}

Table 4 continuing

Samples*	(CN)	(K)	(NA)	(W)	(TE)
Control*	27.25±0.35C ^g	25.25±0.35A ^h	34.25±0.35A ^b	26.10±0.14B ^h	36.50±0.71A ^a
L1	0.00±0.00G ^h	0.00±0.00D ^h	25.20±0.28D ^f	0.00±0.00G ^h	30.25±0.35C ^a
L2	29.25±0.35A ^c	23.25±0.35B ⁱ	30.10±0.14C ^b	30.25±0.35A ^b	26.25±0.35D ^f
L3	13.25±0.35E ^b	0.00±0.00D ^f	0.00±0.00F ^f	10.25±0.35E ^c	20.25±0.35F ^a
L7	28.10±0.14B ^a	0.00±0.00D ^e	0.00±0.00F ^e	0.00±0.00G ^e	15.25±0.35G ^d
C1	20.15±0.21D ^e f ^g	22.20±0.28C ^c	24.25±0.35E ^b	20.25±0.35D ^e f ^g	25.10±0.14E ^a
C3	0.00±0.00G ^b	0.00±0.00D ^b	0.00±0.00F ^b	0.00±0.00G ^b	25.25±0.35E ^a
C6	0.00±0.00G ^f	0.00±0.00D ^f	25.25±0.35D ^c	0.00±0.00G ^f	30.00±0.00C ^a
C9	0.00±0.00G ^g	0.00±0.00D ^g	32.20±0.28B ^a	21.00±0.00C ^f	31.50±0.71B ^b
C15	0.83±0.04F ⁱ	0.00±0.00D ⁱ	24.25±0.35E ^c	7.25±0.35F ^h	25.20±0.28E ^b
B5	20.25±0.35E ^e f ^g	0.00±0.00F ^b	24.90±0.14D ^c	29.25±0.35B ^c	25.25±0.35D ^b
B6	22.75±0.35E ^c	0.00±0.00F ^b	26.25±0.35C ^b	27.75±0.35B ^d	23.75±0.35D ^d
B8	21.00±0.00B ^d e	0.00±0.00E ^b	0.00±0.00E ^f	0.00±0.00E ^g	8.50±0.71D ^g
B11	18.25±0.35F ^h	0.00±0.00G ^b	24.25±0.35D ^d	27.75±0.35B ^d	21.50±0.71E ^e
B12	20.25±0.35C ^e f ^g	0.00±0.00E ^b	0.00±0.00E ^f	24.50±0.71B ^e	0.00±0.00E ⁱ
B15	21.25±0.35F ^d	0.00±0.00G ^b	24.00±0.00D ^d	30.25±0.35B ^b	23.25±0.35E ^d

*: *Salmonella* Typhimurium. Different uppercase letters indicate significant differences ($P < 0.01$) among the antibiotics, while lowercase letters showed differences among the samples

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by the Chairmanship of Scientific Research Projects of Atatürk University (Project number: BAP: 2012/252).

REFERENCES

Abd-Elghany, S.M., Sallam, K.I., Abd-Elkhalek, A., Tamura, T. (2015). Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from chicken meat and giblets. *Epidemiol Infect*, 143: 997-1003.

Angkititrakul, S., Chomvarin, C., Chaita, T., Kanistanon, K., Waethewutajarn, S. (2005). Epidemiology of antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from pork, chicken meat and humans in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 36: 1510-1515.

Anonymous. (2000). Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci-Part 2: Membrane filtration method. Geneva, Switzerland.

Anonymous. (2001). ISO 17410: Microbiology of food and animal feeding stuffs--Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Anonymous. (2006). ISO 4832: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coliforms-Colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Anonymous. (2008). ISO 21527-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds-Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Anonymous. (2009). Turkish Food Codex, microbiological criteria bulletin. Official Journal No. 27133, February 6, 2009, (In Turkish).

- Anonymous. (2013). ISO 4833-1: Microbiology of the food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Bryan, F.L., Doyle, M.P. (1995). Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J Food Prot.* 58: 326-344.
- Çetin, B. (2006). Effects of protective cultures and lactic acid treatments on shelf life and *Salmonella* Typhimurium growth and on inhibition of some potential microorganisms in poultry meat. Ph.D. thesis, Atatürk Univ., Erzurum, Turkey.
- Chakraborty, R., Hazen, T.C., Joyner, D.C., Küsel, K., Singer, M.E., Sitte, J., Torok, T. (2011). Use of immunomagnetic separation for the detection of *Desulfovibrio vulgaris* from environmental samples. *J Microbiol Methods.* 86: 204-209
- Chung, Y.H., Kim, S.Y., Chang, Y.H. (2003). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from foods in Korea from 1993 to 2001. *J Food Prot.* 66: 1154-1157.
- CLSI. (2014). Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplements. This document provides updated tables for the Clinical and Laboratory Standards Institute Antimicrobial Susceptibility Testing Standards M02-A11, M07-A9, and M11-A8, CLSI, Wayne, PA.
- Dallal, M.M.S., Doyle, M.P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi, S., Sharifi-Yazdi, M.K. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control.* 21: 388-392.
- Foddai, A., Elliott, C.T., Grant, I.R. (2010). Maximizing capture efficiency and specificity of magnetic separation for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* cells. *Appl Environ Microbiol.* 76: 7550-7558
- Gürler, Z., Pamuk, S., Yıldırım, Y., Ertas, N. (2015). The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: A focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 96: 79-83.
- Harb, A., Habib, I., Mezal, E.H., Kareem, H.S., Laird, T., O'Dea, M., Abraham, S. (2018). Occurrence, antimicrobial resistance and whole-genome sequencing analysis of *Salmonella* isolates from chicken carcasses imported into Iraq from four different countries. *Int J Food Microbiol.* 284: 84-90.
- Harrigan, W.F. (1998). Laboratory Methods in Food Microbiology. 3rd ed, Academic Press, San Diego, USA.
- Hyeon, J.Y., Chon, J.W., Hwang, I.G., Kwak, H.S., Kim, M.S., Kim, S.K., Choi, I.S., Song, C.S., Park, C., Seo, K.H. (2011). Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in retail meat products. *J Food Prot.* 74: 161-166.
- Iseri, O., Erol, I. (2010). Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. in ground turkey meat. *Br Poult Sci.* 51: 60-66.
- Kavaz Yüksel, A., Yüksel, M. (2015). Determination of certain microbiological quality characteristics of ice cream, detection of *Salmonella* by conventional and immunomagnetic separation methods and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. isolates. *J Food Saf,* 35(3), 385-394.
- Koburger, J.A., Marth, E.H. (1984). Yeast and moulds. Compendium of methods for the examination of foods (APHA), Ed: Speck, M. L., Washington, DC, USA.
- Maturin, L.J., Peeler, J.T. (1998). Aerobic Plate Count. In: Bacteriological Analytical Manual. 8th ed, Chapter 3, Gaitghersburg, MD, USA.
- Mir, I.A., Kashyap, S.K., Maherchandani, S. (2015). Isolation, serotype diversity and antibiogram of *Salmonella enterica* isolated from different species of poultry in India. *Asian Pac J Trop Biomed.* 5: 561-567.
- Park, S.H., Aydın, M., Khatiwarad, A., Dolan, M.C., Gilmore, D.F., Boulding, J.L., Ahnh, S., Rickea, S.C. (2014). Current and emerging

- technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiol.* 38: 250-262.
- Pointon, A., Sexton, M., Dowsett, P., Saputra, T., Kiermeier, A., Lorimer, M., Holds, G., Arnold, G., Davos, D., Combs, B., Fabiansson, S., Raven, G., Mckenzie, H., Chapman A., Sumner, J. (2008). A baseline survey of the microbiological quality of chicken portions and carcasses at retail in two Australian states (2005 to 2006). *J Food Prot.* 71: 1123-1134.
- Procura, F., Bueno, D.J., Bruno, S.B., Rogé, A.D. (2017). Prevalence, antimicrobial resistance profile and comparison of methods for the isolation of *Salmonella* in chicken liver from Argentina. *Food Res Int.* 119: 541-546.
- Ramya, P., Madhavarao, T., Rao, L.V. (2012). Study on the incidence of *Salmonella enteritidis* in poultry and meat samples by cultural and PCR methods. *Vet World.* 5: 541-545.
- Salihu, A.E., Onwuliri, F.C., Mawak, J.D. (2014). Antimicrobial resistance profiles of *Salmonella gallinarum* isolates from free-range chickens in Nasarawa state, Nigeria. *Intl J Bacteriol Res.* 2: 19-27.
- Sanlibaba, P., Tezel, B.U., Senturk, E. (2018). Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from chicken in Turkey. *Korean J Food Sci An.* 38: 391-402.
- Sapkota, A.R., Kinney, E.L., George, A., Hulet, R.M., Cruz-Cano, R., Schwab, K.J., Zhang, G., Joseph, S.W. (2014). Lower prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* on large-scale U.S. conventional poultry farms that transitioned to organic practices. *Sci Total Environ.* 476-477: 387-392.
- Sharma, K.P., Chattopadhyay, U.K. (2015). Assessment of microbial load of raw meat samples sold in the open markets of city of Kolkata. *J Agric Vet Sci.* 8, 24-27.
- Sodagari, H.R., Mashak, Z., Ghadimianazar, A. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from retail chicken meat and giblets in Iran. *J Infect Dev Ctries.* 9; 463-469.
- Taban, B.M., Aytac, S.A. (2009) Application of magnetic immuno-polymerase chain reaction assay for detection of *Salmonella* spp. in chicken meats. *Eur Food Res Technol.* 229: 623-628.
- Uyttendaele, M., Troy, P.D., Debevere, J. (1999). Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. *J Food Prot.* 62: 735-740
- Van, T.T., Moutafis, G., Istivan, T., Tran, L.T., Coloe, P.J. (2007). Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from Vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Appl Environ Microbiol.* 73: 6885-6890.
- Wadud, S., Leon-Velarde, C.G., Larson, N., Odumeru, J.A. (2010). Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria* chromogenic agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J Microbiol Methods.* 81: 153-159.
- Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Pamuk, S., Ertas, N. (2011), Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Res Int.* 44: 725-728.
- Yang, B., Xi, M., Wang, X., Cui, S., Yue, T., Hao, H., Wang, Y., Cui, Y., Alali, W.Q., Meng, J., Walls, I., Wong, D.M., Doyle, M.P. (2011). Prevalence of *Salmonella* on raw poultry at retail markets in China. *J Food Prot.* 74: 1724-1728.
- Yüksel, A.K., Yüksel, M. (2015). Determination of certain microbiological quality characteristics of ice cream, detection of *Salmonella* by conventional and immunomagnetic separation methods and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. isolates. *J Food Safety.* 35: 385-394.
- Zwe, Y.H., Tang, V.C.Y., Aung, K.T., Gutiérrez, R.A., Ng, L.C., Yuk, H.G. (2018). Prevalence, sequence types, antibiotic resistance and, *gyrA* mutations of *Salmonella* isolated from retail fresh chicken meat in Singapore. *Food Control.* 90: 233-240.



TOMBUL FINDIK ÇEŞİDİNDE YAĞ OKSİDASYONUNU AZALTACAK KURUTMA YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ

Ali Turan^{1*} Ali İslam²

¹Giresun Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Fındık Ekspertiği Programı, Giresun

²Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ordu, Türkiye

Geliş / *Received*: 11.02.2019; Kabul / *Accepted*: 13.06.2019; Online baskı / *Published online*: 02.07.2019

Turan, A., İslam, A. (2019). Tombul fındık çeşidinde yağ oksidasyonunu azaltacak kurutma yönteminin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (4): 563-575 doi:10.15237/gida.GD19040

Turan, A., İslam, A. (2019). Determination of drying method for reducing oil oxidation of Tombul (CV) hazelnut. GIDA (2019) 44 (4): 563-575 doi:10.15237/gida.GD190402

ÖZ

Bu çalışma güneşte kurutma (beton harman ve çimen harman; BH, ÇH, sırasıyla) ve suni kurutma (SK) yöntemlerinin depolama süresince fındığın kimyasal özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Protein oranı, yağ oranı, nem oranı, su aktivitesi, aflatoxin, yağ asitleri kompozisyonu, toplam yağ asitleri ve yağ oksidasyon parametreleri 2014-2016 yılları arasında 18 ay ortam şartlarında (20–25°C ve %70–90 nisbi nem) muhafaza süresince incelenmiştir. Çalışma sonucunda tekli doymamış yağ asitleri (TDY) ana grubu oluşturmuş (%81.36–84.46), onu çoklu doymamış yağ asitleri (%9.41–12.18) ve doymuş yağ asitleri (%5.74–7.31) izlemiştir. SK ortamında güneşte kurutmaya göre daha yüksek TDY (%84.46) tespit edilmiştir. Ayrıca SK ortamında daha düşük iyot değeri ve daha yüksek oleik/linoleik değeri bulunmuştur. Bu yüzden SK “Tombul” fındık çeşidinin kurutulması için yeni bir potansiyel olabilir.

Anahtar kelimeler: Depolama, kurutma, yağ asitleri kompozisyonu, yağ oksidasyonu

DETERMINATION OF DRYING METHOD FOR REDUCING OIL OXIDATION OF TOMBUL (CV) HAZELNUT

ABSTRACT

This work was carried out to evaluate the effects of sun-dried (concrete ground and grass ground; CG, GG, respectively) and artificial dried (DM) on chemical properties of hazelnut during storage. The following parameters were measured; protein, lipid and moisture content, water activity, aflatoxin, fatty acid composition, total fatty acids, and oil oxidation along 18 months storage (2014–2016) at 20–25 °C and 70–90% relative humidity. The results showed that monounsaturated fatty acid (MUFA) was the main fatty acid group (81.36–84.46%) followed by polyunsaturated (9.41–12.18%) and saturated fatty acids (5.74–7.31%). Samples dried in DM had more MUFA (84.46%) than those sun-dried samples. Furthermore, the lowest iodine value and the highest oleic/linoleic acidity ratio were found in DM. Hence, DM could be as the new potential for Tombul (cv) hazelnut drying.

Keywords: Storage, drying, fatty acid composition, oil oxidation

*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ali.turan@giresun.edu.tr,

☎ (+90) 454 310 3005

☎ (+90) 454 216 54 57

GİRİŞ

Fındık dünya pazarlarında satılan en önemli sert kabuklu meyve türlerinden biridir ve şu anda Türkiye fındık üretim ve ticaretinin en fazla yapıldığı ülke durumundadır (Turan, 2018a). Ancak günümüze kadar fındıkta modern tekniklerin yaygınlaştırılması konusunda ülkemiz maalesef mesafe alamamıştır. Özellikle meyve kalitesini en fazla etkileyen hasat sonrası yöntemlerinden biri olan kurutma geleneksel olarak güneş altında beton ve çimen zemin üzerinde gerçekleştirilmektedir (Turan ve İslam, 2018). Bu yüzden de fındıklar kurutma ve muhafaza süresince yağ oksidasyonuna maruz kalmaktadır (Turan, 2018b).

Bilindiği gibi kurutma, tarımsal ürünlerde en eski muhafaza yöntemlerinden birisidir (Kaveh vd., 2018) ve gıdaların içerdiği suyun önemli bir kısmının uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Köse, 2018; Zhang vd., 2018). Fındıkların kalite özelliklerini kaybetmeden muhafaza edilebilmesi için ise kurutma süreci sonrasında iç fındık neminin %6 değerinin altında olması tavsiye edilmektedir (Wang vd., 2018). Ayrıca kurutma süresi meyve kalitesinin korunması bakımından hayati öneme sahiptir (Turan, 2019). Bu nedenle fındığın toplandıktan sonra zuruflarının ayrılması ve kısa sürede kurutulması büyük önem arz etmektedir. Çünkü geç kurutulan fındıklarda, küf gelişimi ve zararlılar tarafından hasar görme riski artmakta ve güneş ışığının altında uzun süre kurtulan fındıkların serbest yağ asitliğinin yükseldiği bilinmektedir (Fu vd., 2016; Qu vd., 2016; Turan, 2019). Ayrıca yüksek derecede doymamış yağ asitleri içeriğine sahip fındıklar kurutma sırasında oksijen ve yüksek sıcaklığa maruz kalmaları durumunda yağ oksidasyonuna karşı hassas duruma gelebilirler (Wang vd., 2018). Bu yüzden kurutma süreci yağ oksidasyonunu ve mikrobiyal aktivite gelişimini engellemek için çok dikkatli yürütülmelidir.

Türkiye’de geleneksel kurutma ortamlarından beton harmanın, çimen harmandan fındık kurutma için daha uygun ortam olduğuna dair genel bir kanı mevcuttur. Ancak bu konuda günümüze kadar birkaç çalışma haricinde bilimsel araştırmalara dayalı detaylı veri bulunmamaktadır

(Turan, 2018a). Dahası, Türk fındık çeşitlerinde suni ve geleneksel kurutma yöntemlerinin karşılaştırılması günümüze kadar kapsamlı bir şekilde maalesef yapılmamıştır (Turan ve İslam, 2016; Turan ve İslam, 2018; Turan, 2018b; Turan, 2019). Bu çalışma, geleneksel ve suni kurutma yöntemlerinin “Tombul” fındık çeşidinin kimyasal özellikleri üzerinde muhafazası süresi boyunca meydana getirdiği değişiklikleri araştırarak oksidasyonunu en düşük düzeyde etkileyen kurutma metodunu belirlemek amacıyla yürütülmüştür.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan “Tombul” fındıklar Giresun İli Bulancak İlçesi Şemseddin Mahallesi’nde tek bir bahçeden alınmıştır (1 40°55’31.90” N, 38°14’00.71” E, 110 m). Örnek alınan bahçelerdeki dal sayısı ~5–7 dal/ocak, ocak arası mesafe ~3 m, dekara ocak sayısı ~60 bitki/da ve bahçe ~30 yaşındaki bitkilerden oluşmaktadır. Genellikle yılda iki defa dip sürgünü temizliği yapıldığı gözlenmiş, yaşlı dallar geleneksel yöntemlerle seyreltilmiş ancak bahçede gençleştirme tamamen yapılmamıştır. Gübreleme genelde Mart ayının ortasında ~1 kg/ocak olacak şekilde serpme uygulanmaktadır (CAN, %26 N). Zararlılardan sadece fındık kurduna (*Curculio nucum* L.) karşı genelde Mayıs ayının başında mücadele yapılmaktadır (%50 methiocarp wp, 100 g/da). Ancak yoğun zararı olduğu gözlenen dalkıran zararlısı (*Xyloborus dispar* F.) ve külleme hastalığına [*Phyllactinia guttata* (Wallr.; Fr.) Lev] karşı mücadele yapılmadığı gözlenmiştir. Yıllık ortalama verim ise 60–80 kg/da arasında değişkenlik göstermektedir.

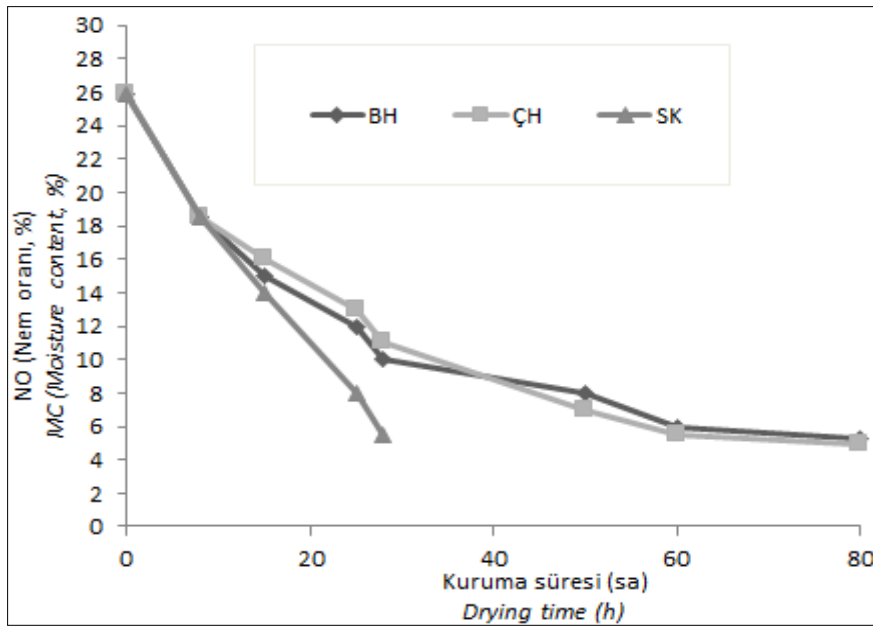
Yöntem

Kurutma yöntemleri

Hasat işlemi 08–19 Ağustos 2014 tarihleri arasında ~%25 nem değerinde (Refsan RK 55, Kütahya, Turkey) yerden hasat şeklinde gerçekleştirilmiştir (Turan ve İslam, 2016). Hasat edilen fındıklar çimen harmana serilmiş ve çotanaklı halde ~3 gün soldurulmuştur (Nem değeri %16.51). Soldurulan fındıklar (22 Ağustos 2014) daha sonra patoz yardımıyla (Dinçler Makine, FPHM 2500, Samsun, Turkey)

çotanaklarından ayrılmış ve kurutma işlemi için üç gruba ayrılmıştır. Grup I; çotanaklarından ayrılmış fındıklar otu motorla biçilmiş (Oleo–Mac 440 T, Italy) çimen harmana (ÇH; 4x3 m boyut, ~30 kg) getirilmiş ve yere serilen branda üzerine (TS 4739, TS 1534–2; EN ISO 2286–2, Kale Tente, İstanbul, Turkey) 5 cm kalınlığında serilmiş ve güneş altında günde en az 3 defa (sabah, öğle ve akşam) karıştırılmıştır. Grup II; fındıklar doğrudan beton harmana (BH; 5x5 m boyut, ~30 kg) serilmiş (TS EN 12390 Gümüšteş Çimento, Giresun, Türkiye) ve güneş altında iklime bağlı olarak günde en az 3 defa karıştırılmıştır. ÇH ve BH metotlarında örnekler ortam şartlarında kurutulmuştur (ortalama rüzgar hızı, ortam sıcaklığı ve nemi ve güneşlenme süresi; 1.4 sa/km, 25.6°C ve 5.24 sa, sırasıyla). ÇH ve BH metotlarında kurutma işlemi her gün saat 08:00–20:00 arasında devam etmiş ve 20:00’den sonra fındıkların nem almaması için üzeri naylon örtü (Metroplast, İstanbul, Türkiye) ile örtülmüştür (Yaygın uygulama). Grup III; fındıklar kurutma makinesi (KM) içerisine elevatör yardımıyla yerleştirilmiş (~1000 kg) ve kurutma işlemi 45°C’de (yaygın kullanım) (FACMA ES 3000,

2013, İtalya; [Turan ve İslam, 2018]) gerçekleştirilmiştir (~30 kg tesadüfen seçilmiş). Sıcak hava ventilator (1.5 m/s hava hızı) yardımıyla kurutucuya iletilmiş ve kurutma süresince arşimet vidası sürekli karıştırma işlemine devam etmiştir. Kurutma süresince 3 sa sıcak hava pompalanmış ve 1.5 sa durdurulmuştur. Bu 1.5 sa süresince ve kurutma süresince saat 20:00–08:00 arası dahil arşimet vidası karıştırma işlemine devam etmiştir. Kurutma işlemi iç fındık nem değeri %6’nin altına düşene kadar devam ettirilmiştir (Turan ve İslam, 2016). Kurutma süreci beton ve çimen harmanda 80 sa, kurutma makinesinde ise 28 sa sürmüştür. Kuruma süresi ve nem değerleri ile ilgili detaylar Şekil 1’de gösterilmiştir. Kurutma işlemi 22–26 Ağustos 2014 tarihleri arasında Ordu ili, Altınordu ilçesi, Karapınar mahallesi (40°58’17.53 K, 37°56’00.41 D, rakım 43 m), Organize Sanayi Bölgesinde (Ordu OSB, Gürsoy Tarımsal Ürünler Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. Entegre Tesisi) yürütülmüştür (Turan, 2018a; Turan, 2019).



Şekil 1 Fındığın suni ve güneşte kuruma süreleri ile kuruma eğrisi (Güneşte kurutma: BH; Beton harman, ÇH; Çimen Harman ve SK; Suni kurutma)

Figure 1 Drying graph for in-shell hazelnut during conventional (sun-dried: BH; concrete ground and ÇH; grass ground) and artificial dried (SK).

Depolama şartları

Kurutulmuş fındıklar 10 kg jüt çuvallarda, palet üzerinde adi depo şartlarında (20–25°C ve 70%–90 nispi nem) 18 ay depolanmıştır.

Yağ ekstraksiyonu

Fındık yağı Ceselsan soğuk pres yağ ekstraksiyon sistemi ile (AISI3004, Ceselsan, Giresun, Türkiye) elde edilmiştir (Basınç kuvveti: 10000 kgf, basınç: 34.7 MPa, sıcaklık: –°C ~+45 °C ve kapasite; 250 g iç fındık; Turan, 2018a).

Protein ve yağ oranı

Protein oranı AOAC standart metoduna göre (N×6.25), 0.5 g örnek kullanılmış ve makro Kjehldahl metodu (metot 940.26) ile (Velp UDK 149, Europe), yağ oranı ise AOAC metoduna göre (AOAC, 2000), 5 g örneğin soxhlet cihazında (110°C sıcaklık) petrol eteri ekstraksiyonu (metot 960.39) ile elde edilmiştir (Velp Ser 148, Milano, Italy).

Nem oranı ve su aktivitesi

Nem oranı, Türk Standartları Enstitüsü (EN ISO 65-2000)–TS 3075/T1 iç fındık standardına göre yapılmıştır (Kösal, 2018; Turan, 2019). Kıyılmış fındıklar (Fakir Motto 800 w, Germany) 105°C sıcaklıkta sabit bir ağırlığa (Refsan RK 55, Kütahya, Turkey) ulaşmaya kadar bekletilmiştir. Su aktivitesi ise (a_w) Novasina a_w Sprint TH 500 (Switzerland) cihazı kullanılarak yapılmıştır (WAA, 2004).

Aflatoksin miktarının belirlenmesi

Total aflatoksin (AF) ve aflatoksin B1 (AFB1) HPLC cihazı (Shimadzu, c2101390892100, RF:10AXL, Japan) kullanılarak elde edilmiştir. 125±0.1 g örnek 0.01 g hassasiyette terazide tartılmış, 4 g NaCl, 150 ml CH₃OH+25 ml saf su ile 3 dk karıştırılmış ve katlı filtre kağıdından süzülüdür. Süzülen örnekten 10 ml alınmış ve 10 ml saf su ile karıştırılmış, toplam 20 ml karışımdan 10 ml immunoafinity kolondan (1-2 damla/s) geçirilmiştir. 1 ml CH₃OH kolondan geçirilerek aflatoksin elüe edilmiş (1 damla/s), 1 ml HPLC grade saf su kolondan geçirilmiş (2 damla/s) ve 5 ml hacimli anber cam kaptan toplanmıştır (toplam hacim 2 ml). 50 µl'si HPLC cihazına enjekte edilmiş ve toplam aflatoksin ve

aflatoksin B1; m (ng/g) =50 g/250 mLX5 mL/2 mL formülü ile hesaplanmıştır (Turan ve İslam, 2018).

Yağ asitleri kompozisyonu

Yağ asitleri kompozisyonu gaz kromatografisi ile (Shimadzu GC–2010, Tokyo, Japan), yağ asidi metil esterlerinin elde edilmesinde ise Ficarra et al. (2010)'a küçük modifikasyon yapılarak Turan (2018a) ve Turan (2019)'a göre yapılmıştır.

Oksidasyon parametreleri

Serbest yağ asitliği (metot Cd 3d-63) AOCS Standard Method (AOCS, 2004)'a, peroksit değeri (metot Cd 8-53) AOCS (AOCS, 2004) (Metrohm, Dosimat 799, Switzerland), ransimat değeri, rancimat 743 device (Metrohm, Switzerland; Velasco vd. 2004)'e göre yapılmıştır. İyot değeri (ID) ise yağ asitleri yüzdesi (Hashempour vd., 2010; Belviso vd., 2017; Turan, 2018a; Turan, 2019) ile hesaplanmıştır (1).

$$ID=(C16:1 \times 1.901)+(C18:1 \times 0.899)+ \\ (C18:2 \times 1.814)+(C18:3 \times 2.737) \quad (1)$$

İstatistiksel analizler

Deneme tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Tanımlayıcı istatistikler SPSS v. 22.0'e göre (Armok, New York: IBM Corp.), istatistiki testler ise SAS–JAMP v. 10.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina) kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Protein oranı

Protein oranı (PO) üzerine kurutma yöntemleri ve muhafaza süresinin etkisi ile ilgili veriler Çizelge 1'de verilmiştir. Kurutma yöntemlerinin protein oranına etkisi önemli bulunmuş ($P < 0.05$; Çizelge 1), ve bu değer %4.15 (SK, 12. ay) ve %16.71 (SK, 18. ay) aralığında değişmiştir. Çalışmamız, Delgado vd. (2017) tarafından kestanelerde (7.00–8.52 g/100 g kuru madde) tespit edilen sonuçlarla benzerlik göstermiş, ancak Turan ve İslam (2016) ve Kermani vd. (2017) tarafından elde edilen sonuçlarla farklılık göstermiştir. Protein oranı üzerine muhafaza süresinin etkisi ise istatistiksel olarak önemli bulunmuş ($P < 0.001$), muhafaza süresince PO değeri dalgalanma göstermekle

birlikte depolama sonundaki değerler başlangıç değerlerinden daha yüksek olmuştur (%15.61–16.71). PO değerinde yaşanan bu tür dalgalanmalar nem değerindeki değişimlerden kaynaklanmış olabilir, çünkü genel olarak muhafaza süresinin PO değerini etkilemediği

belirtilmektedir (Telgado vd., 2017). Ayrıca, Turan ve İslam (2016) ve Koç Güler vd. (2017) çalışmalarında, PO değerinin muhafaza süresince dalgalanmakla birlikte muhafaza süresince azaldığını bildirmişlerdir.

Çizelge 1 Kurutma yöntemlerinin 18 ay depolama süresince fındığın protein, yağ, nem oranı ve su aktivitesi değeri üzerine etkileri

Table 1 Effect of drying methods on protein, lipid and, moisture content and water activity of hazelnut during 18 months of storage periods

Ö/P	M/D	Muhafaza süreleri (ay)/Storage periods (months)							Önemlilik/Sign.	
		0	3	6	9	12	15	18	M/D	MS/S
PO/	BH/CG	16.08±0.10	16.24±0.44	15.78±0.31	16.45±1.11	15.38±0.09	15.76±0.25	16.47±0.11		
PC	ÇH/GG	15.61±0.37	15.66±0.25	15.25±0.46	15.78±0.10	15.38±0.09	15.87±0.19	16.16±0.00	*	*** öd/ns
(%)	SK/DM	15.84±0.54	15.74±0.55	14.73±0.00	15.72±0.36	14.15±0.09	15.70±0.25	16.71±1.92		
YO/	BH/CG	62.53±0.12	56.60±0.35	59.84±0.17	55.00±0.60	61.13±3.03	57.27±4.46	56.43±0.68	öd/ns	***
LC	ÇH/GG	61.80±0.53	55.53±0.31	59.70±3.21	55.81±5.76	59.67±0.50	55.47±0.51	56.84±0.46	öd/ns	
(%)	SK/DM	63.33±1.40	56.87±1.86	57.53±2.84	54.40±1.04	60.47±0.31	57.27±1.62	56.40±0.69		
NO/	BH/CG	4.12±0.03d	3.68±0.03h	3.12±0.03n	4.11±0.03d	4.13±0.03d	3.44±0.01k	3.30±0.03l		
MC	ÇH/GG	4.37±0.03a	3.57±0.03i	3.26±0.02m	4.19±0.01c	3.83±0.02f	3.50±0.01j	3.51±0.01j	***	*** ***
(%)	SK/DM	4.28±0.02b	3.52±0.03j	3.03±0.03o	4.05±0.02e	3.78±0.03g	3.50±0.01j	3.10±0.02n		
SA/	BH/CG	0.70±0.00a	0.47±0.01h	0.35±0.01l	0.60±0.01c	0.60±0.01c	0.52±0.00e	0.45±0.01j		
a_w	ÇH/GG	0.62±0.00b	0.46±0.01i	0.37±0.01k	0.60±0.00c	0.58±0.01d	0.52±0.00e	0.45±0.01j	***	*** ***
	SK/DM	0.60±0.01c	0.49±0.01g	0.35±0.01l	0.60±0.00c	0.60±0.01c	0.50±0.00f	0.45±0.01j		

Ö: Özellik, M: Metot, MS: Muhafaza süresi, BH: Beton harman, ÇH: Çimen harman ve SK: Suni kurutma. PO: Protein oranı, YO: Yağ oranı, NO: Nem oranı ve SA: Su aktivitesi. Ortalama±SD şeklinde ifade edilmiştir. Kurutma yöntemleri ve depolama süreleri arasındaki farklılıklar farklı harflerle gösterilmiştir. Önem seviyeleri; *, **, *** ve “öd” $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ve “önemli değil”

P: Parameter, D: Drying, S: Storage periods, CG: Concrete ground, GG: Grass ground and DM: Drying machine. PC: Protein content, LC: Lipid content, MC: Moisture content and a_w : Water activity. Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters in columns for each different drying, mean significantly different values among storage time. Significant level; *, **, *** and “ns” mean significance at $P < 0.05, 0.01, 0.001$ and “not significant”, respectively, between drying and storage time.

Yağ oranı

Çalışmamızda kurutma yöntemlerinin yağ oranı (YO) üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuş ($P > 0.05$) ve depolama süresince YO değeri %54.40 (SK, 9. ay) 63.33 (SK, başlangıç) aralığında değişmiştir. Kurutma yöntemlerinin YO değerini etkilemediğini bildiren benzer çalışmaların yanı sıra (Turan ve İslam, 2016; Kermani vd., 2017), etkilediğini bildiren (2.22–3.13 g/100 g kuru madde) başka çalışmalarda bulunmaktadır (Delgado vd., 2017). Tespit edilen bu farklılıklar tür, çeşit ya da kurutma yöntemleri ve depolama koşulları gibi bazı etmenlerden kaynaklanmış olabilir. Muhafaza süresince ise beklendiği gibi YO değeri biraz dalgalanma göstermekle birlikte genel olarak azalma eğilimi göstermiştir ($P < 0.001$; Çizelge 1). Ortam şartlarında muhafaza edilen fındıklarda genel

olarak bu yönde bir eğilim gösterdiği bilinmektedir (Turan ve İslam, 2016). Ancak Ghirardello vd. (2013) ortam şartlarında muhafaza edilen fındıklarda YO değerinin arttığını, Koç Güler vd. (2017) ise etkilemediğini bildirmiştir. Tespit edilen bu farklılıklar muhtemelen ortam nemi, kabuk ya da iç fındık özellikleri farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Nem oranı

Fındıkların kalite özellikleri bozulmadan muhafaza edilmesi için nem değerinin (NO) %5 eşik değerini aşmaması önerilmektedir (Özdemir vd., 1998). Türkiye’de fındık alım esaslarına göre ise nem oranının $\leq 6\%$ altında olması gerektiği, aksi halde fındıkların satın alınmadığı bilinmektedir. Kurutma yöntemlerinin nem oranı üzerine etkisi istatistikî olarak önemli görülmüş (P

<0.001), ve en düşük değer %3.03 ile SK yönteminde 6. ayda, en yüksek değer ise %4.37 ile ÇH yönteminde başlangıçta belirlenmiştir. Muhafaza süresinin nem oranı üzerine etkisi ise istatistikî olarak önemli bulunmuş ($P < 0.001$; Çizelge 1) ve bu değer dalgalanma göstermekle birlikte genelde azalmıştır. Çalışmamızda olduğu gibi fındıkta nem değerinin muhafaza süresince genellikle azalmakla birlikte dalgalanma gösterdiğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Turan ve İslam, 2016; Koç Güler vd., 2017; Turan, 2019).

Su aktivitesi

Su aktivitesi (a_w) gıdalarda yağ oksidasyonunu etkileyen en önemli parametrelerden birisi olarak görülmektedir (Turan, 2018a). Ayrıca a_w değeri 0.3-0.5 aralığında yağ oksidasyonunun oldukça düşük olduğu ve bu yüzden iç fındık neminin <%5 değerinin altında olması gerektiği bilinmektedir. Kurutma yöntemleri arasında Turan ve İslam (2016)'ın çalışmalarında olduğu gibi en yüksek değer BH ve ÇH (sırasıyla 0.70, 0.62) metodlarında, en düşük değer ise SK (0.60) metodunda belirlenmiş ve aradaki farklılık önemli görülmüştür ($P < 0.001$; Çizelge 1). Çalışmamızda a_w değeri NO değerinin değişimine benzer eğilim göstermiş ve muhafaza süresince 0.35 (BH ve SK, 6. ay)–0.70 (BH, başlangıç) aralığında seyretmiştir. a_w değerinin muhafaza süresince dalgalı eğilimi bazı dönemlerde Turan ve İslam (2016) ve Koç Güler vd. (2017) çalışmaları ile benzerlik gösterse de, muhafaza süresince azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Ayrıca a_w değerinin iki gün süreyle 0.83'ü aşması durumunda aflatoksinin oluşabileceği, bu nedenle eşik değerini asla aşmaması gerektiği bildirilmiştir (Özay vd., 2008). Çalışmamızda ise elde edilen a_w değerlerinin tamamı 0.72'nin altında olması sebebiyle böyle bir risk oluşmamıştır.

Aflatoksin

Türkiye'de fındıklar genellikle beton ya da çimen harmanda güneş altında kurutulmaktadır. Güneşte kurutma süresince ürünün iklime bağlı yeniden nem alma ihtimali yüzünden küf gelişimi ve mikotoksin riski yüksektir (Özay vd. 2008; Başaran, 2010; Turan ve İslam, 2018). Bu nedenle fındığın hızlı kurutulması ve nem değerinin %5'in

altına düşürülmesi büyük önem arz etmektedir. Aksi halde aflatoksin oluşum ve gelişimi sonucunda ürünün zarar görmesi muhtemeldir. Ancak çalışmamızda, beklenenin aksi yönde gelişme olmuş ve özellikle BH ve ÇH metodları ile muhafaza ortamı aflatoksin gelişimi için uygun koşulları sağlamasına rağmen söz konusu etmen tespit edilmemiştir (< 0.1 ng/g). Elde edilen bu verilerden, Turan ve İslam (2016) ve Turan ve İslam (2018)'de belirtildiği gibi aflatoksinin meyvenin gelişimi aşamasında oluşmıyorsa sonradan şartların uygun olması halinde bile gelişmediği görülmüştür.

Yağ asitleri kompozisyonu

Çizelge 2'de görüldüğü gibi Tombul çeşidi toplam 13 yağ asidi içermekte olup, bunlar arasında en yüksek oranda oleik asit (C18:1), bunu linoleik (C18:2), palmitik (C16:0), ve stearik (C18:0) yağ asitleri takip etmiş ve kurutma metodları ile depolamanın etkisi istatistiksel olarak önemli görülmüştür ($P < 0.001$). Ayrıca çalışmada kaproik asit (C6:0), kaprilik (C8:0), kaprik (C10:0), laurik (C12:0), eikosadienoik (C20:2), erusik (C22:1), dokosadienoik (C22:2) ve lignoserik (C24:0) yağ asitleri tespit edilecek düzeyde bulunamamıştır (< 0.001). Çalışmamızda majör grup, toplam yağ asitlerinin ~%99.00'sini oluştururken minör grup ise toplam yağ asitlerinin ~%0.5' lik kısmını oluşturmuştur (Çizelge 2). Yağ asitleri kompozisyonu üzerine çeşit, orijin, yetiştirme koşulları, olgunluk, gübreleme, hasat zamanı, sezon, toprak tipi, iklim, rakım ve depolama koşulları gibi pek çok faktör etki etmektedir (Amaral vd., 2006; Alaşalvar vd., 2010; Hashempour vd., 2010; Jawnowicz ve Lenart, 2018). Örneğin, Tüfekçi ve Karataş (2018) Orta Karadeniz Bölgesi fındıklarının yüksek miktarda doymuş (%8.45) ve tekli doymamış yağ asidi (%83.45), fakat düşük miktarda çoklu doymamış yağ asidi (%7.8) içerdiğini, Doğu Karadeniz Bölgesi fındıklarının ise yüksek miktarda linoleik (%9.10) ve linolenik (%0.09) asit içerdiğini bildirmiştir. Ayrıca Alaşalvar vd. (2010) "Tombul" çeşidinin %5.61 palmitik (C16:0), %82.16 oleik (C18:1) ve % 8.26 linoleik (C18:2) asit içerdiğini, "Palaz" çeşidinin ise %6.64 palmitik (C16:0), %81.97 oleik (C18:1) ve %8.32 linoleik (C18:2) asit içerdiğini, Çakıldak çeşidinin

ise %5.02 palmitik (C16:0), %80.99 oleik (C18:1) ve %10.63 linoleik (C18:2) asit içerdiğini bildirmiştir. Turan (2018a) ise Ordu Levant

fındıklarının %3.84 palmitik (C16:0), %84.51 oleik (C18:1) ve %10.04 linoleik (C18:2) asit içerdiğini bildirmiştir.

Çizelge 2 Kurutma yöntemlerinin fındığın 18 ay depolama süresince yağ asitleri kompozisyonu üzerine etkileri

Table 2 Effect of drying methods on fatty acids composition of hazelnut during 18 months of storage periods.

Ö/P	M/D	Muhafaza süreleri (ay)/ Storage periods (months)							Önemlili k/ Sign.
		0	3	6	9	12	15	18	
C14:O (%)	BH/CG	0.02±0.01de	0.02±0.01de	0.02±0.00e	0.03±0.01de	0.04±0.00c	0.05±0.01abc	0.05±0.00ab	*** **
	ÇH/GG	0.02±0.01de	0.02±0.01de	0.04±0.00c	0.05±0.01abc	0.04±0.01bc	0.05±0.01a	0.05±0.00ab	
	SK/DM	0.03±0.01d	0.03±0.01d	0.04±0.01bc	0.05±0.00ab	0.05±0.01abc	0.05±0.00ab	0.04±0.01bc	
C1:O (%)	BH/CG	4.19±0.11de	4.19±0.11de	4.29±0.03cde	4.31±0.02cd	4.29±0.02cde	4.53±0.02b	4.53±0.01b	*** **
	ÇH/GG	3.80±0.16gh	3.71±0.10h	3.78±0.01gh	3.79±0.01gh	3.78±0.01gh	4.39±0.01bc	4.40±0.01bc	
	SK/DM	3.94±0.07fg	3.94±0.05fg	4.75±0.44a	4.40±0.01bc	4.39±0.03bc	4.13±0.02de	4.12±0.01ef	
C16:1 (%)	BH/CG	0.08±0.01bc	0.09±0.01bc	0.08±0.01cde	0.07±0.01def	0.08±0.01cde	0.10±0.01ab	0.10±0.00a	*** **
	ÇH/GG	0.07±0.01cde	0.09±0.01bc	0.08±0.01cd	0.09±0.01bc	0.10±0.01ab	0.07±0.01def	0.08±0.01cde	
	SK/DM	0.07±0.01efg	0.07±0.01efg	0.05±0.01h	0.06±0.01fgh	0.06±0.00gh	0.08±0.01cde	0.07±0.01def	
C17:O (%)	BH/CG	0.02±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01	0.02±0.01	0.03±0.00	0.05±0.01	0.05±0.00	*** **
	ÇH/GG	0.03±0.00	0.03±0.01	0.02±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01	0.06±0.00	0.05±0.01	
	SK/DM	0.03±0.01	0.04±0.01	0.03±0.02	0.05±0.01	0.05±0.00	0.06±0.01	0.06±0.00	
C17:1 (%)	BH/CG	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.00	0.06±0.01	0.06±0.00	0.06±0.01	0.05±0.01	öd/ns
	ÇH/GG	0.05±0.01	0.06±0.01	0.05±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.06±0.01	0.05±0.01	
	SK/DM	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.03	0.05±0.01	0.05±0.01	0.06±0.00	0.05±0.01	
C18:0 (%)	BH/CG	1.93±0.04cd	1.93±0.04cd	1.90±0.03cde	1.87±0.01def	1.86±0.01efg	2.56±0.01a	2.54±0.01a	*** **
	ÇH/GG	1.85±0.05efg	1.86±0.05efg	1.79±0.06gh	1.80±0.02fgh	1.80±0.01fgh	1.60±0.01i	1.55±0.01i	
	SK/DM	2.09±0.16b	1.95±0.01c	1.87±0.03de	1.80±0.02fgh	1.78±0.01h	2.11±0.02b	2.09±0.02b	
C18:1 (%)	BH/CG	84.17±0.03a	84.14±0.05ab	84.02±0.02ac	84.02±0.01abc	84.00±0.02a-d	81.90±0.02g	81.91±0.02g	*** **
	ÇH/GG	83.92±0.06bd	83.90±0.02bd	83.91±0.04bd	83.79±0.01cd	83.77±0.03d	82.10±0.02g	82.10±0.01g	
	SK/DM	84.22±0.19a	84.03±0.06ab	82.75±0.62e	82.50±0.05f	82.50±0.01f	81.11±0.05h	81.11±0.02h	
C18:2 (%)	BH/CG	9.31±0.17f	9.32±0.17f	9.35±0.01f	9.37±0.02f	9.37±0.03f	10.35±0.00d	10.34±0.02d	*** **
	ÇH/GG	9.91±0.07e	10.00±0.03e	9.99±0.02e	10.12±0.02de	10.11±0.03de	11.35±0.03b	11.40±0.02b	
	SK/DM	9.19±0.05f	9.51±0.09f	10.12±0.87de	10.73±0.03c	10.78±0.03c	12.05±0.05a	12.10±0.01a	
C18:3 (%)	BH/CG	0.09±0.01def	0.09±0.01def	0.10±0.01cde	0.09±0.01def	0.10±0.01cde	0.10±0.01cde	0.09±0.01def	*** **
	ÇH/GG	0.11±0.02ab	0.12±0.01a	0.10±0.00cd	0.09±0.01efg	0.10±0.01cde	0.10±0.00cd	0.10±0.01cde	
	SK/DM	0.12±0.01a	0.12±0.01a	0.12±0.01ab	0.11±0.01bc	0.10±0.01cde	0.08±0.01fg	0.08±0.00g	
C20:0 (%)	BH/CG	0.07±0.01f	0.06±0.01f	0.07±0.01ef	0.06±0.01f	0.07±0.01ef	0.08±0.01bc	0.09±0.01ab	*** **
	ÇH/GG	0.08±0.00bcd	0.08±0.01cd	0.08±0.00bcd	0.09±0.01ab	0.08±0.01bc	0.08±0.01bc	0.09±0.01ab	
	SK/DM	0.07±0.01de	0.08±0.01cd	0.08±0.01cd	0.08±0.00bcd	0.08±0.01bc	0.09±0.01a	0.09±0.01ab	
C20:1 (%)	BH/CG	0.03±0.01hi	0.03±0.01hi	0.03±0.00i	0.03±0.01i	0.04±0.00h	0.10±0.00a	0.10±0.00a	*** **
	ÇH/GG	0.06±0.01cde	0.07±0.01bcd	0.07±0.01bcd	0.06±0.01def	0.06±0.01efg	0.05±0.01fg	0.05±0.00g	
	SK/DM	0.07±0.02b	0.07±0.00bc	0.06±0.01efg	0.06±0.00def	0.06±0.01efg	0.06±0.01efg	0.05±0.00g	
C22:0 (%)	BH/CG	0.04±0.01efg	0.03±0.01fg	0.03±0.01g	0.03±0.01fg	0.04±0.01efg	0.05±0.00abc	0.05±0.01bcd	*** **
	ÇH/GG	0.04±0.01def	0.04±0.01cde	0.05±0.01bcd	0.04±0.01cde	0.05±0.01bcd	0.04±0.00def	0.05±0.01bcd	
	SK/DM	0.05±0.01ab	0.05±0.01ab	0.03±0.01fg	0.05±0.00abc	0.05±0.01ab	0.06±0.01a	0.05±0.01ab	
C24:1 (%)	BH/CG	0.04±0.01e-h	0.04±0.01e-h	0.04±0.01efg	0.05±0.01ef	0.04±0.01efg	0.09±0.01b	0.10±0.00a	*** **
	ÇH/GG	0.02±0.01i	0.03±0.01hi	0.04±0.01f-I	0.04±0.01f-I	0.03±0.01ghi	0.05±0.01ef	0.05±0.00de	
	SK/DM	0.04±0.01efg	0.05±0.00de	0.05±0.01de	0.06±0.00cd	0.05±0.01ef	0.06±0.01c	0.07±0.01c	

Ö: Özellik, M: Metot, MS: Muhafaza süresi, BH: Beton harman, ÇH: Çimen harman ve SK: Suni kurutma. Ortalama±SD şeklinde ifade edilmiştir. Kurutma yöntemleri ve depolama süreleri arasındaki farklılıklar farklı harflerle gösterilmiştir. Önem seviyeleri; *, **, *** ve "öd" P < 0.05, 0.01, 0.001 ve "önemli değil"

P:Parameter, D: Drying, S: Storage periods, CG: Concrete ground, GG: Grass ground and DM: Drying machine. Values are expressed as mean ±standart deviation. Different letters in columns for each different drying, mean significantly different values among storage time. Significant level; *, **, *** and "ns" mean significance at P < 0.05, 0.01, 0.001 and "not significant", respectively, between drying and storage time.

Doymuş yağ asitleri (DYA), tekli doymamış yağ asitleri (TDY), çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDY), doymamış/doymuş yağ asitleri oranı (TDY+ÇDY/DYA), oleik/linoleik oranı (O/L), iyot değeri (ID), serbest yağ asitliği (SYA), ransimat değeri (RD) ve peroksit değeri (PD) Çizelge 3'de görülmektedir. Beklendiği gibi, TDY (%84.15–84.46) ana yağ asidi grubu oluşturmuş, onu ÇDY (%9.31–10.02) ve DYA (%5.83–6.27) izlemiştir. Alaşvar vd. (2010) benzer sonuçlar elde etmiş ve fındıkların düşük oranda DYA (%7.46–9.59), orta düzeyde ÇDY (%3.92–13.86) ve yüksek miktarda ÇDY (%78.10–87.26) içerdiğini bildirmiştir. Turan (2018a) ise benzer şekilde fındıkların düşük oranda DYA (%5.77), orta düzeyde ÇDY (%10.15) ve yüksek düzeyde TDY (%84.76) içerdiğini bildirmiştir. Ancak Amaral vd. (2006), TDY ana grup yağ asitlerini oluştururken DYA ve ÇDY yağ asitlerinin eşit seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Kurutma yöntemlerinin toplam yağ asitleri ve yağ oksidasyonu üzerine etkisi istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$) ve veriler Çizelge 3'de verilmiştir. En yüksek DYA değeri BH (%6.27) metodunda kaydedilirken en düşük değer ise ÇH (%5.82) kaydedilmiştir. Özdemir vd. (2002) "Tombul" ile Turan (2018b) ise Ordu Levant fındıklarında elde edilen verilerde olduğu gibi kurutma metotları arasındaki farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.001$; Çizelge 3). Ancak, cevizlerde ise güneşte ve fırında kurutma yöntemlerinin palmitik (%6.08–6.64) ve stearik asit (%1.77–1.71) üzerine etkili olmadığı görülmüştür (Qu vd., 2016). Muhafaza süresi boyunca ise DYA değerinde bazı dönemlerde dalgalanma görülmekle birlikte artış görülmüştür (%5.74–7.30; Çizelge 3). Ghirardello vd. (2013) ve Turan (2018a) ortam şartlarında muhafaza edilen fındıklarda DYA değerinin yükseldiğini (%7.69–8.51, %5.63–6.14, sırasıyla), Belviso vd. (2017) ise kavurma sıcaklığı ve çeşide göre farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Örneğin, Tonda Gentile Trilobata (TGT) çeşidinde kavurma sıcaklığının artışı ile DYA muhafaza süresince azalış (170°C–20 dk; %9.73–9.32), Ordu fındıklarında ise artış (%7.37–7.61) olduğu görülmüştür.

TDY temel olarak oleik (C18:1) yağ asidinden oluşmuş ve bunu palmitoleik (C16:1), eikosenoik

(C20:1), heptadesenoik (C17:1), ve nervonik (C24:01) yağ asitleri takip etmiş, kurutma yöntemleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmuş ($P < 0.001$) ve en yüksek TDY değeri SK (%84.46), en düşük ise GG (%84.15) metodunda kaydedilmiştir (Çizelge 3). Çalışmamızın aksine Turan (2018a) en yüksek TDY değerinin BH (%85.03), ve en düşük değerinin ise SK (%84.38) metodunda olduğunu bildirmiştir. Özdemir vd. (2002) ise Tombul fındık çeşidinde kurutma sıcaklığının artışı ile oleik asit değerinin yükseldiğini (35–50°C; %81.0–83.3, sırasıyla), Delgado vd. (2016) ise çeşitlere göre farklılık görünmekle birlikte kestanelerde kurutma süresinin artışı ile azaldığını (0–10 sa; %36.2–32.3, sırasıyla), Delgado vd. (2017) ise kurutma yöntemlerine göre %37.95–29.9 arasında değiştiğini bildirmiştir. TDY değeri muhafaza süresince ise beklediği gibi azalma göstererek %84.46–81.36 aralığında seyretmiş (Çizelge 3) ve Belviso vd. (2017) tarafından TGT ve Turan (2018a) Ordu Levant fındıklarında elde edilen verilerle benzerlik göstermiştir. Ancak Delgado vd. (2017) ise kestanelerde depolama süresince kurutma yöntemlerine göre TDY değerinin farklı davranış gösterdiğini bildirmiştir. Genel olarak linoleik (C18:2) ve linolenik (C18:3) yağ asitlerinin ÇDY'nın en iyi temsilcisi olduğu (Turan 2018a) ve linoleik asit değerinin her zaman toplam yağ asitlerinin %9'unun altında olduğu bildirilmiş (Ghirardello vd., 2013), ancak çalışmamızda Tombul çeşidinde böyle olmadığı (%9.31–10.03) görülmüştür (Çizelge 3). Kurutma yöntemleri arasında, en yüksek ÇDY değeri ÇH (%10.02), en düşük değer ise SK (%9.31) metodunda kaydedilmiş, farklılık istatistikî olarak önemli bulunmuş ($P < 0.001$; Çizelge 3) ve Delgado vd. (2017) ile benzerlik göstermiştir. Muhafaza süresince ise ÇDY değeri dalgalanma göstermekle birlikte genellikle artış göstermiştir (Çizelge 3). Belviso vd. (2017) benzer şekilde muhafaza süresince ÇDY değerinin kavrulmuş fındıklarda artış gösterdiğini, Ghirardello vd. (2013) ise linoleik asit (C18:2) oranının ortam şartlarında 12 ay muhafaza süresince yükseldiğini (%6.16–6.87), ancak linolenik asit (C18:3) değerinin azalış gösterdiğini (%0.13–0.00) bildirmiştir.

Çizelge 3 Kurutma yöntemlerinin 18 ay depolama süresince fındığın toplam yağ asitleri ve yağ oksidasyonu üzerine etkileri

Table 3 Effect of drying methods on sum of fatty acids and oil oxidation of hazelnut during 18 months of storage periods

Ö/P	M/ D	Muhafaza süreleri (ay)/ Storage periods (months)							Önemlilik/Sig.	
		0	3	6	9	12	15	18	M/DMS/S	MxMS/DxS
DYA/ SFA (%)	BH/CG	6.27±0.10d-g	6.27±0.10d-g	6.33±0.01c-f	6.32±0.02c-f	6.32±0.02c-f	7.32±0.03a	7.30±0.01a	***	***
	ÇH/GG	5.82±0.10h	5.74±0.05h	5.77±0.06h	5.79±0.02h	5.79±0.01h	6.23±0.01efg	6.18±0.02fg		***
	SK/DM	6.23±0.21efg	6.10±0.05g	6.81±0.47b	6.42±0.03cde	6.40±0.03cde	6.49±0.01c	6.46±0.01cd		
TDY/ MUFA (%)	BH/CG	84.38±0.02ab	84.35±0.06ab	84.23±0.01abc	84.22±0.02abc	84.22±0.03abc	82.24±0.03c	82.26±0.02c	***	***
	ÇH/GG	84.15±0.09bc	84.14±0.02bc	84.14±0.04bc	84.01±0.02c	84.00±0.03c	82.33±0.02e	82.33±0.01e		***
	SK/DM	84.46±0.17a	84.27±0.05ab	82.96±0.66d	82.74±0.04d	82.72±0.01d	81.37±0.05f	81.36±0.02f		
ÇDY/ PUFA (%)	BH/CG	9.41±0.17f	9.41±0.17f	9.44±0.01f	9.46±0.02f	9.46±0.02f	10.45±0.01d	10.44±0.02d	***	***
	ÇH/GG	10.02±0.00e	10.12±0.04de	10.09±0.02e	10.20±0.01de	10.21±0.03de	11.45±0.03b	11.49±0.02b		***
	SK/DM	9.31±0.05f	9.64±0.10f	10.23±0.88de	10.84±0.03c	10.88±0.03c	12.14±0.05a	12.18±0.01a		
TDY+ÇDY/ DYA/MUFA+ PUFA: SFA	BH/CG	14.96±0.26b-e	14.96±0.26b-e	14.80±0.02c-f	14.82±0.04c-f	14.82±0.04c-f	12.67±0.05h	12.69±0.01h	***	***
	ÇH/GG	16.17±0.29a	16.42±0.14a	16.34±0.17a	16.28±0.05a	16.26±0.03a	15.06±0.01bcd	15.18±0.05bc		***
	SK/DM	15.07±0.54bcd	15.40±0.14b	13.73±1.00g	14.57±0.07ef	14.63±0.09def	14.40±0.01f	14.48±0.02f		
O/L	BH/CG	9.04±0.16ab	9.03±0.17ab	8.99±0.01ab	8.97±0.02ab	8.97±0.03ab	7.91±0.00d	7.92±0.01d	***	***
	ÇH/GG	8.47±0.06c	8.39±0.03c	8.40±0.01c	8.28±0.01c	8.28±0.03c	7.24±0.02e	7.20±0.01e		***
	SK/DM	9.16±0.03a	8.83±0.08b	8.22±0.74c	7.69±0.02d	7.65±0.02d	6.73±0.03f	6.70±0.00f		
ID/IV	BH/CG	92.98±0.30c	92.96±0.26c	92.90±0.01c	92.92±0.02c	92.91±0.02c	92.85±0.01c	92.85±0.02c	***	***
	ÇH/GG	93.89±0.11b	94.06±0.06b	93.99±0.08b	94.08±0.02b	94.10±0.03b	94.80±0.03a	94.89±0.02a		***
	SK/DM	92.85±0.23c	93.27±0.14c	93.16±1.16c	94.05±0.05b	94.11±0.05b	95.16±0.04a	95.23±0.02a		
SYA/ FFA (%, oleic acid)	BH/CG	0.24±0.02kl	0.28±0.01ij	0.36±0.00fg	0.42±0.02e	0.99±0.04a	0.89±0.01b	0.61±0.02c	***	***
	ÇH/GG	0.28±0.02ij	0.22±0.01l	0.33±0.00gh	0.41±0.02e	0.60±0.02c	0.60±0.04c	0.52±0.01d		***
	SK/DM	0.15±0.02m	0.31±0.02hi	0.26±0.01jk	0.42±0.01e	0.37±0.02f	0.33±0.01gh	0.55±0.02d		
RD (sa)/ RV (h)	BH/CG	5.88±0.04a	4.06±0.03cde	3.59±0.22f	4.31±0.25cd	1.88±0.10i	2.00±0.19hi	3.85±0.06ef	***	***
	ÇH/GG	5.34±0.14b	4.30±0.13cd	4.11±0.16cde	4.36±0.06c	2.84±0.27g	2.28±0.12h	4.05±0.21cde		***
	SK/DM	5.62±0.14ab	5.37±0.06b	4.22±0.44cde	4.21±0.36cde	4.27±0.49cd	3.95±0.20def	3.99±0.31de		
PD/ PV (meqO ₂ /kg)	BH/CG	0.00±0.00j	0.46±0.03a	0.17±0.02ef	0.18±0.02def	0.44±0.04a	0.15±0.04efg	0.03±0.05ij	**	***
	ÇH/GG	0.06±0.10hi	0.18±0.04def	0.08±0.02hi	0.20±0.01cde	0.23±0.02cd	0.10±0.02fg	0.34±0.03b		***
	SK/DM	0.00±0.00j	0.35±0.04b	0.25±0.01c	0.11±0.02gh	0.13±0.01fg	0.25±0.02c	0.24±0.02c		

Ö: Özellik, M: Metot, MS: Muhafaza süresi, BH: Beton harman, ÇH: Çimen harman ve SK: Suni kurutma. Ortalama±SD şeklinde ifade edilmiştir. Kurutma yöntemleri ve depolama süreleri arasındaki farklılıklar farklı harflerle gösterilmiştir. Önem seviyeleri; *, **, *** ve “öd” P < 0.05, 0.01, 0.001 ve “önemli değil”

P: Parameter, D: Drying, S: Storage periods CG: Concrete ground, GG: Grass ground and DM: Drying machine. Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters in columns for each different drying, mean significantly different values among storage time. Significant level; *, **, *** and “ns” mean significance at P < 0.05, 0.01, 0.001 and “not significant”, respectively, between drying and storage time.

Qu vd. (2016) and Juhaimi vd. (2018) tarafından bulunan sonuçların aksine, çalışmamızda doymamış/doymuş (TDY+ÇDY/DYA) yağ asitleri üzerine kurutma yöntemlerinin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş (P < 0.001; Çizelge 3), TDY+ÇDY/DYA değeri %14.96–16.17 aralığında değişmiş ve en yüksek değer ÇH, en düşük değer ise BH metodunda kaydedilmiştir. TDY+ÇDY/DYA oranı fındıklarda raf ömrünü tahmin etmek için kullanılmakta ve oranın düşük olması raf ömrünün yüksek olduğunu göstermektedir. Bu oranın “Tombul” çeşidinde %17.12, “Çakıldak” çeşidinde %13.82 ve raf ömrü en uzun “Cavcava” çeşidinde ise %7.84 olduğu bilinmektedir (Özdemir vd., 1998). Buradan da, ÇH metodunun muhafaza için en uygun yöntem

olmadığı söylenebilir. Muhafaza süresince TDY+ÇDY/DYA değeri bazı dönemlerde küçük dalgalanmalar göstermekle Ghirardello vd. (2013), Belviso vd. (2017) ve Turan (2018a) çalışmalarına benzer şekilde muhafaza süresince azalma göstermiştir.

Yağ oksidasyonu

Fındık yağlarında oleik (C18:1) ve linoleik (C18:2) doymamış yağ asitleri yüksek oranda bulunmakta ve bu nedenle de oksidasyona karşı hassas oldukları bilinmektedir (Alaşalvar vd., 2010; Turan 2018b). Ayrıca oleik/linoleik asit oranı (O/L) fındıkların iç kalitesini değerlendirmede kullanılan önemli özelliklerden birisidir ve linoleik asit, oleik aside oranla oksidasyona karşı daha

duyarlıdır (Qu vd., 2016). Bu nedenle O/L oranının yüksek olması oksidasyona karşı daha dayanıklı olduğunun göstergesidir (Belviso vd., 2017; Turan 2018a). Çalışmamızda kurutma yöntemlerinin O/L oranı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ($P < 0.001$; Çizelge 3) en yüksek değer SK (9.16), en düşük değer ise ÇH (8.47) metodunda kaydedilmiştir. Cevizlerde ise Qu vd. (2016) fırında kurutulan örneklerde oleik asit (C18:1) değerinde önemli oranda artış (%12.52–21.11, sırasıyla) olduğunu, linoleik asit (C18:2) değerinde azalma (%70.41–61.05) olduğunu ve bizim bulguların aksine bu değerlerin güneşte kurutmada daha yüksek olduğu bildirmiştir. Muhafaza süresince ise kurutma yöntemlerinin tamamında genel olarak Belviso vd. (2017) benzer şekilde azalma kaydedilmiştir. İyot değeri (İD) yağların doymamışlığının bir ölçüsü olarak bilinmekte ve absorbe edilen iyot miktarı olarak ifade edilmektedir (Ajith vd., 2015; Belviso vd., 2017; Turan 2018a). Ayrıca İD değerinin yüksek olması yağ oksidasyonuna karşı daha hassas ve kararsız olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Diğer yandan da doymamış yağ asitleri oranı düşük olan fındıklarda İD değerinin de daha düşük olduğu bilinmektedir. Bunlara ilave olarak, Özdemir vd. (2002) İD değerinin Tombul çeşidinde kurutma sıcaklığının artışına paralel artış gösterdiğini bildirmiştir (sırasıyla, 35–50°C; 87.7–89.0). Çalışmamızda ise, Turan (2018a)'e benzer şekilde kurutma yöntemlerinin İD değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ($P < 0.001$; Çizelge 3) ve en düşük değer SK (92.85), en yüksek değer ise ÇH (93.89) metodunda görülmüştür. Muhafaza süresince ise, İD değerinde Belviso vd. (2017) tarafından yürütülen çalışmaya benzer şekilde artış görülmüştür.

Serbest yağ asitliği (SYA) kalite kaybının ilk göstergesi olarak kabul edilmekte ve SYA ≥ 1 değerinin üzerine çıkması bozulma göstergesi olarak bilinmektedir (Turan ve İslam, 2018). Çalışmamızda, SYA değeri kurutma yöntemlerine göre farklılık göstermiş ($P < 0.001$; Çizelge 3) ve en yüksek değer ÇH (%0.28, oleik asit), en düşük değer ise SK (%0.15, oleik asit) metodunda kaydedilmiştir. Benzer sonuçlar Fu vd. (2016) ve

Qu vd. (2016) tarafından da tespit edilmiş ve güneş ışığı altında uzun süre kurutulan cevizlerde yağ moleküllerinin SYA salgıladıkları ve bu nedenle değerinin yükseldiği bildirilmişlerdir. Ancak Kashaninejad vd. (2003) kurutma yöntemlerinin antepfistiklerinde SYA değerini etkilemediğini bildirmiştir. Muhafaza süresi boyunca ise SYA değeri yükselerek %0.16–0.99 arasında kaydedilmiş ve çalışmamıza benzer şekilde davranış gösteren bazı çalışmalarda da aynı yönde değişim olduğu görülmüştür (Turan ve İslam, 2016; Koç Güler vd., 2017; Turan, 2018a; Turan, 2019). Muhafaza süresi sonunda ise en yüksek SYA değeri BH (%0.61, oleik asit) metodunda kaydedilmiş ve bu sonuç yağların bozulmasında eşik olarak görülen (%0.7, oleik asit) sınır değerinin altında gerçekleşmiştir. Ancak BH metodunda 12 ve 15. aylarda (%0.99–0.89 oleik asit, sırasıyla) eşik değerinin üzerinde seyretmiştir. Bu nedenle, ortam şartlarında jüt çuvalda muhafaza edilen kabuklu Tombul çeşidinin SYA değeri bakımından 18 ay muhafaza edilebileceği (ÇH ve SK metodlarında) görülmüştür. Kurutma yöntemlerinin RD üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ($P < 0.001$; Çizelge 3) ve en yüksek değer SK ve BH (5.62–5.88 sa, sırasıyla) metodlarında kaydedilmiştir ($P < 0.001$; Çizelge 3). Turan ve İslam (2016) güneşte kurutma yöntemlerinde daha düşük RD tespit ettiklerini, bu nedenle suni kurutma yöntemlerinin kısa sürede kurutma ve yüksek RD değeri nedeniyle tercih edilmesi gerektiğini bildirmiştir. Ancak çalışmamızda güneşte kurutma ve suni kurutma yöntemleri arasında böyle bir farklılık tespit edilmemiştir. Muhafaza süresi boyunca ise beklendiği ve başka çalışmalarda olduğu gibi (Turan ve İslam, 2018; Turan, 2019) RD azalmış ve bu azalma 5.88–1.88 sa aralığında gerçekleşmiştir ($P < 0.001$; Çizelge 3). 18 ay muhafaza süresi boyunca ise en düşük değerler genel olarak BH ve ÇH metodlarında gerçekleşmiştir.

Peroksit değeri (PD) fındık sanayisi tarafından depolanacak ürünlerde kullanılan önemli özelliklerdendir (Ghirardello vd., 2013; Koç Güler vd., 2017; Turan, 2018b) ve ayrıca PD cevizlerde yağ oksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilmektedir (Fu vd.,

2016). Çalışmamızda, kurutma yöntemlerinin PD değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.01$; Çizelge 3), en düşük değerler genel olarak SK ve en yüksek değerler ise BH ve ÇH metotlarında kaydedilmiştir. Muhafaza süresince ise PD değeri genelde dalgalanma göstermekle birlikte artış göstermiş ($P < 0.001$; Çizelge 3) ve bu değişim bir zirve değere ulaştıktan sonra benzer çalışmalarda olduğu gibi (Koç Güler vd., 2017; Belviso vd., 2017; Turan 2018a) düşüş şeklinde gerçekleşmiştir. Bu durumun ise, muhafaza sırasında PD'nin ikincil oksidasyon ürünlerine dönüşmesinden kaynaklandığı bilinmektedir (Turan, 2018a; Turan, 2019). Ancak başka çalışmalarda ise PD değerinin muhafaza süresi boyunca artış gösterdiği görülmüştür (Ghirardello vd., 2013; Raisi vd., 2015; Turan, 2019). Tespit edilen bu farklılıklar çeşit, kurutma yöntemi ve muhafaza koşulları gibi bazı faktörlerin bir veya birkaçının etkileşiminden kaynaklanmış olabilir (Amaral vd., 2006; Alaşalvar vd., 2010; Turan 2018a; Turan, 2019). Bu faktörlerin yanı sıra, fındıklarda farklı kurutma yöntemleri farklı zaman-sıcaklık profilleri oluşturabildiği ve bu yüzden her süreçte farklı kimyasal reaksiyonun oluşabileceği öngörülmektedir. Kimyasal reaksiyonların bazılarında ise, fındığın içeriğini oluşturan bileşenlerle diğer kimyasallar reaksiyona girebilir ve bu değişimler analizlerde ölçülemeyebilir (Özilgen, 2014; Turan, 2019).

SONUÇ

Bu çalışma suni ve doğal kurutma yöntemlerinin uzun dönem depolama süresince "Tombul" fındık çeşidinin yağ asitleri kompozisyonu ve yağ oksidasyonu üzerine etkisi konusunda yapılan ilk çalışmadır. Çalışma sonucunda kurutma yöntemleri ve depolamanın yağ asitleri kompozisyonu ve yağ oksidasyon üzerine etkisi yöntemlere göre genel olarak farklılık göstermiştir. Çalışma sonucunda SK ortamında BH ve ÇH ortamlarına göre daha düşük SYA, PD ve ID tespit edilmiştir. Bu yüzden SK ortamı "Tombul" fındık çeşidinin kurutulması için tavsiye edilebilir yöntem olarak öne çıkmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (ODUBAP-TF1332), Altaş Yağ Sanayi (Ordu, Turkey) ve Gürsoy Tarımsal Ürünler Gıda Sanayi A.Ş. (Ordu, Turkey) tarafından desteklenmiştir. İstatistiksel analizler için Dr. Öğr. Üyesi Fatih ÖNER'e teşekkür ederiz. Bu çalışma Ali TURAN'ın doktora çalışmasının bir kısmından oluşmaktadır.

KAYNAKLAR

- Ajith, S., Pramod, S., Kumari, C.P., Potty, V.P. (2015). Effect of storage temperatures and humidity on proximate composition, peroxide value and iodine of raw cashew nuts. *J Food Sci Technol*, 52: 4631–4636 doi: 10.1007/s13197-014-1476-6.
- Alaşalvar, C., Pelvan, E., Topal, B. (2010). Effect of roasting oil and fatty acid composition of Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.). *Int J Food Sci. Nutr*, 61: 630–642 doi: 10.1021/f101039f.
- Amaral, J.S., Casal, S., Citová, I., Santos, A., Seabra, R.M., Oliveira, B.P.P. (2006). Characterization of several hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars based in chemical, fatty acid and sterol composition. *Eur Food Res Technol*, 222: 274–280 doi: 10.1007/s00217-005-0068.
- AOCS (2004). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 5th ed. American Oil Chemist Society, USA.
- AOAC (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International 17th ed. 40, 1–3.
- Başaran, P. (2010). Antifungal effect of acids and surface active compounds for postharvest control of *Aspergillus paraticus* growth on hazelnut. *J Food Process and Preserv*, 35: 236–246 doi: 10.1111/j.1745-4549.2009.00442.x.
- Belviso, S., Bell, B.D., Giacosa, S., Bertolino, M., Ghirardello, D., Giordano, M., Rolle, L., Gerbi, V., Zeppa, G. (2017). Chemical, mechanical and sensory monitoring of hot air and infrared roasted hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during nine months of storage. *Food Chem*, 217: 398–408 doi: 10.1016/j.2016.08.103.

- Delgado, T., Pereira, J.A., Ramalhosa, E., Casal, S. (2016). Effect of hot air convective drying on the fatty acid and vitamin E composition of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) slices. *Eur Food Res Technol*, 242: 1299–1306 doi: 10.1007/s00217-015-2633–5.
- Delgado, T., Pereira, J.A., Ramalhosa, E., Casal, S. (2017). Comparison of different drying methods on the chemical and sensory properties of chestnut (*Castanea sativa* M.) slices. *Eur Food Res Technol*, 243: 1957–1971 doi: 10.1007/s00217-017-2902–6.
- Ficarra, A., Lo Fiego, D.P., Minelli, G., Antonelli, A. (2010). Ultra fast analysis of subcutaneous pork fat. *Food Chem*, 121: 809–814 doi: 10.1016.2010.01.003.
- Fu, M., Qu, Q., Yang, X., Zhang, X. (2016). Effect of intermittent oven drying on lipid oxidation, fatty acids composition and antioxidant activities of walnut. *LWT–Food Sci Technol*, 65: 1126–1132 doi: 10.1016.2015.10.002.
- Ghirardello, D., Contessa, C., Valentini, N., Zeppa, G., Rolle, R., Gerbi, V., Botta, R. (2013). Effect of storage condition on chemical and physical characteristics of hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Postharvest Biol and Technol*, 81: 37–43 doi: 10.1016.2013.02.014.
- Hashempour, A., Ghazvini, R.F., Bakhshi, D., Sanam, S.A. (2010) Fatty acids composition and pigments changing of virgin olive oil (*Olea europea* L.) in five cultivars grown in Iran. *Aust J Crop Sci* 4:258–263.
- Janowicz, M., Lenart, A (2018). The impact of high pressure and drying processing on internal structure and quality of fruit. *Eur Food Res Technol*, 244:1329–1340 doi: 10.1007/s00217- 018-3047-y.
- Juhaimi, F.A., Özcan, M.M., Uslu, N., Ghafoor, K. (2018). The effect of drying temperatures on antioxidant activity, phenolic compounds, fatty acid composition and tocopherol contents in citrus and oils. *Eur Food Res Technol*, 55: 190–197 doi: 10.1007/s13197-017-2895-y.
- Kashaninejad, M., Tabil, L.G., Mortazavi, A., Safeordi, A. (2003). Effect of drying methods on quality of pistachio nuts. *Dry Technol*, 21: 821–838 doi: 10.1081/DRT-120021688.
- Kaveh, M., Gilandeh, Y.A., Chayjan, R.A., Taghinezhad, E., Mohammadigol, R. (2018). Mas transfer, physical, and mechanical characteristics of terebinth fruit (*Pistacia atlantica* L.) under convective infrared microwave drying. *Heat Mass Transf*, 54: 1879–1899 doi: 10.1007/s00231-018-2287-5.
- Kermani, A.M., Khashehchi, M., Kouravand, S., Sadeghi, A. (2017). Effect of intermittent microwave drying on quality characteristics of pistachio nuts. *Dry Technol*, 35: 1108–1116 doi: 10.1016.2008.01.003.
- Koç Güler, S., Bostan, S.Z., Con, A.Z. (2017). Effects of gamma irradiation on chemical and sensory characteristics of natural hazelnut kernels. *Postharvest Biol Technol*, 123: 12–21 doi: 10.1016.2016.08.007.
- Köksal, A.İ. (2018). *Türk fındık çeşitleri*. Karadeniz fındık ve Mamulleri İhracatçılar Birliği–İstanbul Fındık ve Mamulleri İhracatçılar Birliği, Ankara, 182s.
- Köse, Y.E. (2018). Matematiksel modellemenin kurutma teknolojisinde kullanım olanakları. *Int J Sci Technol Res*, 4(6): 1–8.
- Özay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S., Yılmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: A 3-year study. *Food Addict Contam*, 25: 209–218 doi: 10.1080/02652030701711016.
- Özdemir, M., Özay, G., Seyhan, F.G. (1998). *Hasattan ambalaja fındık işleminin kritik kontrol noktalarında tehlike analizi*. Marmara Araştırma Merkezi. Gebze-Kocaeli, Türkiye, 39s.
- Özdemir, M., Yıldız, M., Gürcan, T.Ş. (2002). Effect of artificial trying air temperature on stability of the major Turkish hazelnut variety Tombul. *GIDA*, 27: 35–39.
- Özilgen, S. (2014). *Cooking as a chemical reaction: culinary science with experiments*. CRC Press, USA, 283 p.

- Qu, Q., Yang, X., Fu, M., Chen, Q., Zhang, X., He, Z., Qiao, X. (2016). Effects of three conventional drying methods on the lipid oxidation, fatty acids composition, and antioxidant activities of walnut (*Juglans regia* L.). *Dry Technol*, 34: 822–829 doi: 10.1080/07373937.2015.1081931.
- Raisi, M., Ghorbani, M., Mahoonak, A.S., Kashaninejad, M. (2015). Effect of storage atmosphere and temperature on the oxidative stability of almond kernels during long-term storage. *J Stored Prod Res*, 62: 16–21 doi: 10.1016/j.jspr.2015.03.004.
- Turan, A., İslam, A. (2016). Changes during storage period and the drying methods in the Çakıldak hazelnut cultivar. *Ordu Univ J Sci Tech*, 6: 272–285.
- Turan, A., İslam, A. (2018). Effect of drying methods on some chemical characteristics of hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during storage. *J Inst Sci Tech*, 8(3): 11–19 doi: 10.21597/jist.458541.
- Turan, A. (2018a). Effect of drying methods on fatty acid profile and oil oxidation of hazelnut oil during storage. *Eur Food Res Technol*, 244(12): 2181–2190 doi: 10.1007/s00217-018-3128-y.
- Turan, A. (2018b). Effect of drying methods on nut quality of hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *J Food Sci Technol*, 55(11): 4554–4565 doi: 10.1007/s13197-018-3391-8.
- Turan, A. (2019). Effect of drying on the chemical composition of Çakıldak (cv) hazelnuts during storage. *Grasas Aceites*, 70(1), e296 doi: 10.3989/gya.0693181.
- Tüfekçi, F., Karataş, Ş. (2018). Determination of geographical origin Turkish hazelnuts according to fatty acid composition. *Food Sci Nutr*, 00: 1–6 doi: 10.1002/fsn3.595.
- Velasco, J., Anderson, M.L., Skibsted, L.H. (2004). Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spins resonance spectroscopy with the rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chem*, 85: 623–632 doi: 10.1016.2003.07.020.
- WAA (2004). *Operating Manual Novasina*. AW Sprint TH 500 Water Activity Analyzers.
- Wang, W., Jung, J., McGorin, R.J., Traber, M.G., Leonard, G.C., Zhao, Y. (2018). Investigation of drying conditions on bioactive compounds, lipid oxidation, and enzyme activity of Oregon hazelnuts (*Corylus avellana* L.). *LWT–Food Sci Technol*, 90: 526–534 doi: 10.1016/j.lwt.2018.01.002.
- Zhang, L., Wang, Z., Shi, G., Yang, H., Wang, X., Zhao, H., Zhao, S. (2018). Effects of drying methods on the nutritional aspects, flavor, and processing properties of Chinese chestnuts. *J Food Sci Technol*, doi: 10.1007/s13197-018-3227-6.

YENİ BİR ÜRÜN–KAKAOLU KESTANE KREMASI ÜRETİMİNDE KAVURMA SICAKLIĞININ ETKİSİ

Oğuz Aydemir*

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Çankırı, Türkiye

Geliş / Received: 17.04.2019; Kabul / Accepted: 12.06.2019; Online baskı / Published online: 02.07.2019

Aydemir, O. (2019). Yeni bir ürün - Kakaolu kestane kreması üretiminde kavurma sıcaklığının etkisi. GIDA (2019) 44 (4): 576-584 doi: 10.15237/gida.GD19072

Aydemir, O. (2019). The effect of roasting temperature in production of cocoa chestnut cream - A new product. GIDA (2019) 44 (4): 576-584 doi: 10.15237/gida.GD19072

ÖZ

Bu araştırma kapsamında, farklı kestane kavurma sıcaklıkları ve sürelerinin yeni bir ürün olan kakaolu kestane kremasının fiziksel, tekstürel ve duyuşal özelliklerine etkisi incelenmiştir. Laboratuvar ölçekli model üretimde iki farklı kestane kavurma sıcaklığı (150 ve 200 °C) ve süresi (20 dk. ve 40 dk.) çalışılmıştır. Kestane kavurma sıcaklığı arttıkça hızlandırılmış yağ ayrılması, sürülebilirlik, yapışkanlık, a^* , b^* ve ΔE^* değerleri artış gösterirken su aktivitesi, L^* değeri ve renk-görünüş puanı azalmıştır. Kestane kavurma sıcaklığı ve süresinin tat-aroma puanı üzerinde önemli bir etkisi olmadığı gözlenirken, yapı-tekstür puanları üzerinde ise belirli bir trende sahip olmayan etkisinin olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, en uygun özelliklere sahip ürünün 200 °C'de 40 dk. kavruan kestaneden üretilen kakaolu kestane kremasının olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kestane, kakaolu kestane kreması, kavurma, tekstür, duyuşal

THE EFFECT OF ROASTING TEMPERATURE IN PRODUCTION OF COCOA CHESTNUT CREAM–A NEW PRODUCT

ABSTRACT

In this study, the effect of different chestnut roasting temperatures and times on the physical, textural and sensory properties of cocoa chestnut cream as a new product was investigated. Two different chestnut roasting temperatures (150 and 200 °C) and times (20 min and 40 min) were studied in laboratory scale model production. As the chestnut roasting temperature increased, accelerated oil separation, spreadability, stickiness, a^* , b^* , and ΔE^* values increased, while water activity level, L^* values and colour-appearance score decreased. It was observed that the temperature and time of chestnut roasting did not have a significant effect on taste-aroma score, but has a significant effect that do not show a specific trend on body-texture score. As a result, it was concluded that the product with the most suitable properties was the cocoa chestnut cream produced from the chestnut roasting at 200 °C for 40 minutes.

Keywords: Chestnut, cocoa chestnut cream, roasting, texture, sensory

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author

✉ oaydemir@karatekin.edu.tr

☎ (+90) 376 218 9532 / 8353

☎ (+90) 376 218 9536

GİRİŞ

Kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerinde yetişen kayıngiller familyasına ait kestane ağacının (*Castanea sativa* Mill.) tohumları halk arasında “kestane” olarak bilinen önemli bir sert kabuklu meyve çeşididir (Saraçoğlu vd., 2015). Kestanenin dünya üzerinde ilk yayılma merkezinin Kastamonu (Kastanis) ili olduğu bildirilmiştir (Bozoğlu, 2019). 2017 yılında en fazla kestane üreten ilk üç ülke sırasıyla Çin (1939719 ton), Bolivya (85047 ton) ve Türkiye (62904 ton) olmuştur (FAOSTAT, 2019). Türkiye’deki üretimin büyük bir kısmı Ege, Marmara ve Karadeniz bölgesinde gerçekleştirilmektedir. Kestanenin bileşiminde (kuru madde bazında % olarak) toplam karbonhidrat 75.32–86.31, toplam şeker 10.32–22.79, invert şeker 0.08–1.25, nişasta 54.45–69.70, sakaroz 8.86–21.28, kül 1.02–3.22, ham selüloz 3.58–5.96, toplam yağ 0.49–2.01, toplam protein 4.88–10.87 seviyesinde bulunurken, ayrıca Ca, Mg, P ve K için iyi bir kaynak teşkil etmektedir (Ertürk vd., 2006).

Yüksek kaliteli kestaneler, endüstriyel olarak dondurulmuş, sterilize edilmiş, konserve edilmiş (koruyucu bir sıvı ile), şişelenmiş (koruyucu bir sıvı ile) veya kurutulmuş gibi çeşitli formlarda değerlendirilmektedir. Düşük kaliteli ürünlerin yeni ürünlere işlenmesi, kestane ürünlerinin değerinin artırılmasının ve endüstriyel işlemeden kaynaklanan atık madde seviyelerinin azaltılmasının alternatif ve ekonomik olarak karlı bir yoldur (De Vasconcelos vd., 2010). Yüksek nişasta içeriği göz önüne alındığında, mevcut yüksek kestane arzı alternatif yiyeceklerin bileşiminde veya biyoteknolojik amaçlar için kullanılabilir. Aşırı üretimin değerlendirilmesi için iki alternatif endüstriyel yaklaşım önerilmiştir; çölyak hastalarına yönelik şekerleme ürünleri için tatlı unun geliştirilmesi ve fermente edilmiş kestanenin damıtılması ile alkollü içeceklerin üretimi (Blaiotta vd., 2012). Ülkemizde kestane üretimi ve verimi 1990’lı yıllardan bu yana hastalıklar nedeniyle azalma eğilimi göstermektedir. Yurtiçi ve yurtdışı talebi arttırmak için geleneksel ve yenilikçi işlenmiş kestane ürünlerinin geliştirilmesi çok önemlidir. Sektör paydaşlarının gerekli önlemleri alması

durumunda, gelecekte kestane endüstrisi tatmin edici bir şekilde gelişecektir (Bozoğlu vd., 2019).

Kavurma işleminin, kestane unlarının lezzetlerini muhafaza etmelerinde ve lezzetin iyileştirilmesinde potansiyel olarak katkı sağladığı gözlenmiştir. Kavrulmuş kestane ununun, kavrulmamış olan ile karşılaştırıldığında daha yüksek toplam fenolik bileşen ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu, böylece kavurma işleminin potansiyel olarak sağlığı iyileştirici özellik kazandırdığı gözlenmiştir. Farklı kavurma yöntemlerinin, daha iyi besinsel ve aromatik özelliklere sahip kestane ürünleri için sanayileşme potansiyeli vardır (Wani vd., 2017).

Kestane temelli yeni ekonomik ürünlerin geliştirilmesi, fındık/fıstık alerjisi ve çölyak hastaları gibi özel gruplara alternatif olacağı gibi kestane yetiştiricilerini de teşvik edici olacaktır. Kestane kreması üretiminde, kestane şekerinde olduğu gibi iri ve bütün tanelere gereksinim yoktur. Kestane üretim sırasında öğütülmektedir. Bu da parçalı ve küçük ürünlerin değerlendirilmesi anlamına gelmektedir. Kakaolu kestane kreması bu anlamda yeni bir ürün olma potansiyeli taşıyabilir. Türkiye’de böyle bir ürün yoktur. Dünya çapında ticari olarak az miktarda ancak değişik niteliklerde sürülebilir kestane ürünlerinin üretildiği görülmektedir. Bununla birlikte kestane kreması ile ilgili bir bilimsel araştırma raporu bulunamamıştır. Bu çalışmanın amacı, kestane temelli yeni bir ürün olan kakaolu kestane kreması üretiminde fırında kavurma sıcaklığının ürünün fiziksel, tekstürel ve duyuşsal özellikleri üzerindeki etkisini araştırmaktır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada kullanılan kestaneler Sinop’ta yetiştirilmiş olup Sinop ili pazarından temin edilmiştir. Krema üretiminde kullanılan materyaller: Pudra şekeri, kakao tozu, yağsız süt tozu ve demineralize (%70) yağsız peynir altı suyu tozu (Katkı Dünyası, Gemicici Gıda, İstanbul), krema tipi susuz margarin ve ayçiçek yağı (Orkide, Küçükbay A.Ş., İzmir), ayçiçek lesitini (Alfasol, Kimbiotek, İstanbul), tuz ve vanilin ise yerel pazardan temin edilmiştir.

Yöntem

Kestane Kavurma İşlemi

Kestanelerin kavurma işlemi için iki farklı sıcaklık (150 ve 200 °C) ve iki farklı süre (20 ve 40 dk.) denenmiştir (Çizelge 1). Dış kabuğundan soyulan kestaneler iç zarından ayrılmış ve metal tepsilere dizilerek etüvde (UN160, Memmert, Almanya) kavurulmuştur (Şekil 1).

Çizelge 1. Deneme planı

Table 1. Experimental plan

Numune Kodu	Kavurma sıcaklığı (°C)	Kavurma süresi (dk.)
Sample Code	Roasting temperature (°C)	Roasting time (min.)
A1	150	20
A2	150	40
B1	200	20
B2	200	40
C	-	-



A1



A2



B1



B2



C

Şekil 1. Kestane numunelerine ait fotoğraflar

Figure 1. Photos of chestnut samples

Kakaolu Kestane Kreması Üretimi

Kestane kremalarının bileşimi Çizelge 2'de sunulmuştur. Kakaolu kestane kreması üretimi için, kavru lan kestaneler öncelikle bıçaklı karıştırıcı içinde 2 dk. öğütülmüştür (HR1372/90,

Philips, Polonya). Daha sonra inceltmesi ve konçlanması için öğütülmüş kestaneler ve kullanılacak sıvı yağın % 20'si melanjere (granit kâse değirmende bir granit taş) (ECGC-12SLTA, Cocotown, ABD) yerleştirilmiştir. Geriye kalan

bütün kuru malzemeler bir kaptaki karıştırılmış ve kuru bileşenler ve kalan yağ kademeli olarak melanjere eklenmiştir. Kullanılan yağ karışımı, ağırlıkça %73 ayçiçek ve %27 susuz margarin içerecek şekilde hazırlanmıştır. Konçlama işlemi toplam 4 saat sürmüştür. Deney numuneleri (her parti için 1 kg), 300 g'lık cam kavanozlara doldurulmuş ve analizlerden önce 15 gün boyunca 24 ± 0.5 °C'de muhafaza edilmiştir. Kestane kreması üretimi iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2. Kakaolu kestane kreması bileşimi
Table 2. Composition of cocoa chestnut cream

Bileşenler Ingredients	İçerik (g/100 g krema) Contents (g/100 g cream)
Kestane	7.5
Şeker	44
Yağ	31
Kakao tozu	7
Süt tozu	6.5
Peynir altı suyu tozu	3.3
Lesitin	0.5
Vanilin	0.1
Tuz	0.1

Hızlandırılmış Yağ Ayrılması

Hızlandırılmış yağ ayrılması (HYA) analizi, Aryana vd. (2003)'nin vermiş olduğu yöntemden uyarlanmıştır. 7.5 g kestane kreması bir santrifüj tüpüne tartılmış ve 10 dk. 20 °C'de 20000 g (3–30 KS, Sigma, Almanya) santrifüj kuvvete tabi tutulmuştur. Santrifüj işleminden sonra tüp üzerinde biriken ayrılmış yağ otomatik pipetle toplanmış ve tartılmıştır. 7.5 g numuneden ayrılan yağın miktarı, 100 g numuneden ayrılan yağ olarak HYA (g yağ/100 g numune) şeklinde hesaplanmıştır.

Tekstür Analizi

Sürülebilirlik analizi TA.XT Plus Tekstür analiz cihazı (Stable Micro Systems, Godalming, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kestane kreması örnekleri oda sıcaklığında (24 ± 1 °C) TTC sürülebilirlik teçhizatı (HDP/SR, 14580) içine yerleştirilmiş ve analiz koşulları uygulanmıştır: Prob 25 mm mesafe ön ayarı; test hızı 10 mm/s; sıkıştırma mesafesi 23 mm. Elde edilen veriler

Texture Exponent Version 4.013.0 (Stable Micro Systems) ile hesaplanmıştır.

Su aktivitesi ölçümü

Kestane kremalarının su aktivitesi ölçümleri 25 °C'de termostatlı su aktivite ölçüm cihazında gerçekleştirilmiştir (AquaLab 4 TE, Pullman, WA, ABD.)

Renk ölçümü

Kestane kreması örneklerinin L^* , a^* ve b^* değerlerini belirlemek için bir renk ölçer (CR-400, Konica Minolta, Japonya) kullanılmıştır. Kestane kremaları CM-A98 cam hücreye doldurulmuş ve yüzeyinden renk ölçümleri yapılmıştır. Krema numunelerinin toplam renk farklılıklarını belirlemek için ΔE^* değeri de aşağıdaki formül ile bulunmuştur:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Duyusal Analiz

Duyusal analizler Çankırı Karatekin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi öğretim elemanları ve öğrencilerinden oluşan kısmi eğitimli panelist grubu (40 kişi) tarafından 9 puan üzerinden (1: Berbat, 2: Çok kötü, 3: Kötü, 4: Biraz kötü, 5: Ne iyi ne kötü, 6: Biraz iyi, 7: İyi, 8: Çok iyi, 9: Harika) tat-aroma, 5 puan üzerinden (1: Berbat, 2: Kötü, 3: Ne iyi ne kötü, 4: İyi, 5: Harika) yapı-tekstür ve renk-görünüş yönünden hazırlanan hedonik skalaya göre değerlendirilmiştir. Numune numaraları 3 basamaklı sayı şeklinde kodlanmıştır. Yapı-tekstür değerlendirmesi sırasında bir bıçak yardımı ile kremaların ekmeğe sürülebilirliği de test edilmiştir. Panelistlere numuneler arası ağız tadı dengeleme amacıyla su ve ekme verilmiştir.

İstatistik analiz

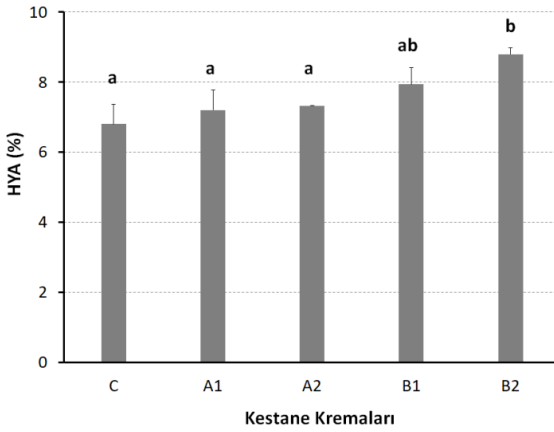
Veriler SPSS 22 paket programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Tek yönlü varyans analizi ve ortalamaların karşılaştırılması için Duncan çoklu karşılaştırma testi (%95 güven aralığında) kullanılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Hızlandırılmış yağ ayrılması (HYA)

Kestane kremalarının HYA değerleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Kestane krema çeşidinin HYA değerleri üzerinde önemli etkiye sahip olduğu

bulunmuştur ($P<0.05$). Kavurma sıcaklığı ve süresi arttıkça kestane kremalarının HYA değerleri de artış göstermiştir. Ziaolhagh vd. (2017) ceviz içi kremasında Ma vd. (2011) yeşil mercimek ve sarı bezelye ununda kavurmanın benzer etkilerini saptamışlardır. Hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımlardan oluşan protein, yağ absorplama kapasitesini etkileyen ana bileşendir (Jitngarmkusol vd., 2008). Kavurma işlemi, lipitlerle çok iyi bağlanma gösteren hidrofobik proteinlerde denatürasyona sebep olup, yağ ayrılmasını artırmış olabilir (Kinsella, 1976). B2 numunesi (200 °C'de 40 dk. kavru lan kestanden üretilen krema), A1, A2 ve C numunelerinden önemli düzeyde yüksek HYA değeri göstermiştir ($P<0.05$).



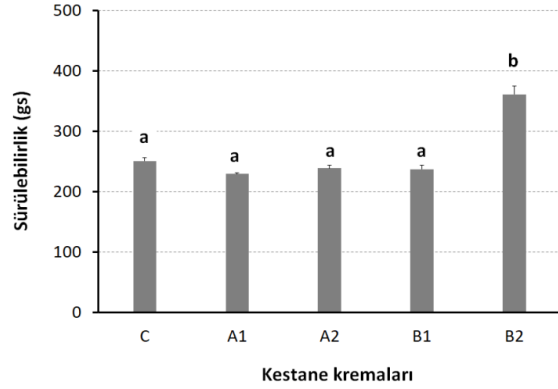
Şekil 2. Kakaolu kestane kremalarına ait HYA değerleri

Figure 2. HYA values of cocoa chestnut creams

Tekstürel özellikler

Kestane kremalarına ait sürülebilirlik değerleri Şekil 3'te verilmiştir. Kestane krema çeşidinin sürülebilirlik değerleri üzerinde önemli etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($P<0.05$). 200 °C'de 40 dk. kavru lan kestanden üretilen krema (B2), diğer numunelerden önemli düzeyde yüksek sürülebilirlik değeri göstermiştir ($P<0.05$). B2 numunesinin sürülebilirlik değeri Aydemir (2019)'in belirttiği ticari kakaolu fındık kreması numunelerine daha yakındır. B2 hariç diğer numunelerin sürülebilirlik değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$). Bu da B2 numunesi dışındaki diğer numunelerin daha yumuşak ve akışkan yapıda olduğu anlamındadır.

Nişasta–şeker–süt içeren karışımın sıcaklığının 75° C'den 95 °C'ye yükselmesi ile birlikte meydana gelen nişasta jelinizasyonu viskoziteyi artırmıştır (Abu-Jdayil vd., 2004). Fırında kavurma işleminde, kabuğundan soyulmuş bütün kestanenin iç sıcaklığı en çok 200 °C'lik kavurma sırasında yükselmiş, bu da viskoziteyi dolayısıyla sürülebilirlik değerini yükseltmiş olabilir.



Şekil 3. Kakaolu kestane kremalarına ait sürülebilirlik değerleri

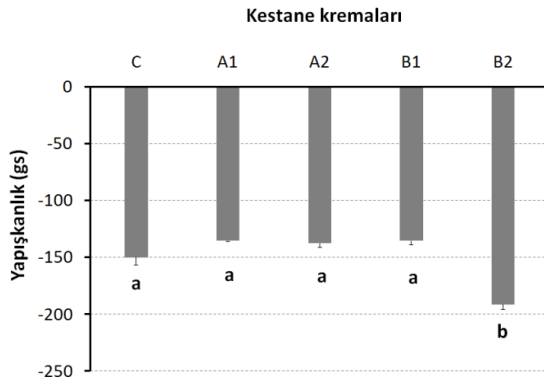
Figure 3. Spreadability values of cocoa chestnut creams

Kestane kremalarına ait yapışkanlık değerleri Şekil 4'te verilmiştir. Kestane kavurma işlem koşulları, krema numunelerinin yapışkanlık değerleri üzerine önemli etkiye sahip olmuştur ($P<0.05$). B2 numunesi (200 °C'de 40 dk. kavru lan kestanden üretilen krema), diğer numunelerden önemli düzeyde yüksek yapışkanlık değeri göstermiştir ($P<0.05$). B2 numunesinin yapışkanlık değeri Aydemir (2019)'in belirlediği ticari kakaolu fındık kreması numunelerine daha yakındır. B2 hariç diğer numunelerin yapışkanlık değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$). Artan kavurma sıcaklığı en fazla 200 °C'lik kavurma sırasında kestande nişastasının jelinize olmasını etkilemiş ve yapışkanlık değerini yükseltmiş olabilir.

Su aktivitesi

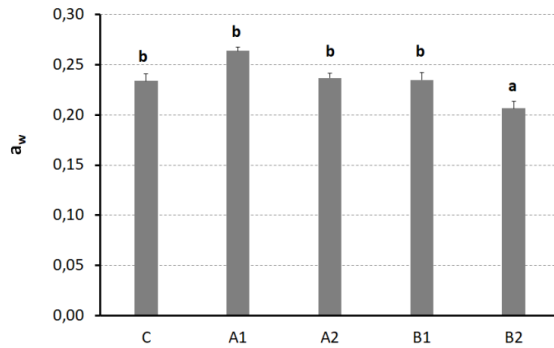
Kestane kremalarının su aktivitesi değerleri Şekil 5'te gösterilmiştir. Numunelerin su aktivite değerleri 0.207 (B2) ile 0.264 (A1) arasında değişim göstermiştir. Kestane krema çeşidinin su aktivitesi değerleri üzerinde önemli etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($P<0.05$). B2 numunesi (200

°C'de 40 dk. kavruktan üretilen krema), diğer numunelerden önemli düzeyde düşük su aktivitesi değeri göstermiştir ($P<0.05$). B2 numunesinin kavurma işlemi sırasında serbest su kaybının en yüksek düzeyde olması neticesinde bu durum normal karşılanabilir. Diğer numuneler arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$).



Şekil 4. Kakaolu kestane kremalarına ait yapışkanlık değerleri

Figure 4. Stickiness values of cocoa chestnut creams



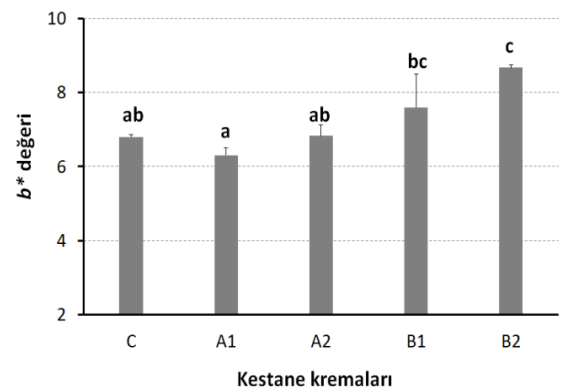
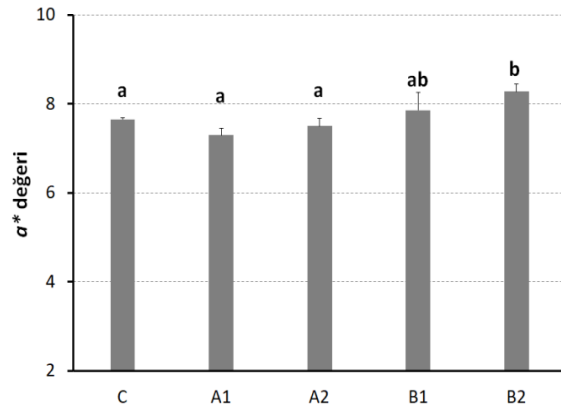
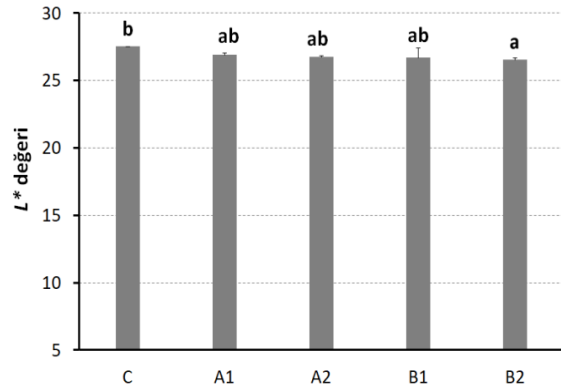
Şekil 5. Kakaolu kestane kremalarına ait su aktivitesi değerleri

Figure 5. Water activity values of cocoa chestnut creams

Renk Özellikleri

Kestane kremalarına ait L^* değerleri Şekil 6'da verilmiştir. Kestane kavurma sıcaklık ve süresi L^* değerleri üzerinde önemli etkiye sahip olmuştur ($P<0.05$). B2 numunesi (200 °C'de 40 dk. kavruktan üretilen krema), diğer numunelerden daha düşük L^* değeri göstermiştir. Bunun anlamı B2 numunesinin koyuluğu (siyaha yakınlığı) en yüksektir. B2 hariç diğer numunelerin

L^* değerleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$). En düşük koyuluk yani en açık renge sahip olan kestane kreması hiç kavurma işlemi uygulanmayan C numunesi olmuştur. Artan kavurma sıcaklığı kestane kremalarının L^* değerini düşürmüştür. Kavurma renkte koyulaşmaya yol açmıştır.



Şekil 6. Kakaolu kestane kremalarına ait L^* , a^* ve b^* değerleri

Figure 6. L^* , a^* and b^* values of cocoa chestnut creams

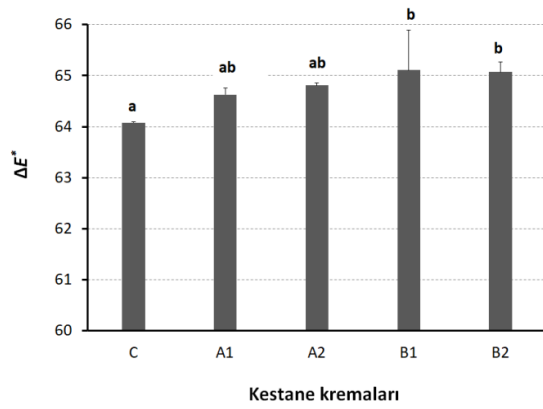
Kestane kremalarına ait a^* değerleri Şekil 6'da verilmiştir. Kestane kavurma sıcaklık ve süresi a^* değerleri üzerinde önemli etkiye sahip olmuştur ($P<0.05$). B2 numunesi (200 °C'de 40 dk. kavru lan ke staneden üretilen kre ma), diğ er numunelerden daha yüksek a^* değ eri göstermiştir. Bunun anlamı B2 numunesinin kırmızı rene ge olan yakınlığı en yüksektir. B2 hariç diğ er numunelerin a^* değ erleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$). En düşük kırmızılık, 120 °C'de 20 dk. kavru lan ke stan e kre ma sı numunesinde bulunmuştur. Artan kavurma sıcaklığı ke stan e kre ma larının a^* değ erini yükseltmiştir. Kavurma işle mi renkte kızarmaya yol açmıştır.

Kestane kremalarına ait b^* değ erleri Şekil 6'da verilmiştir. Kestane kavurma sıcaklık ve süresi b^* değ erleri üzerinde önemli etkiye sahip olmuştur ($P<0.05$). B2 numunesi (200 °C'de 40 dk. kavru lan ke staneden üretilen kre ma), diğ er numunelerden daha yüksek b^* değ eri göstermiştir. Bu, B2 numunesinin sarı rene ge daha yakı n olduğunu göstermektedir. En düşük sarı renk, 120 °C'de 20 dk. kavru lan ke stan e kre ma sı numunesinde bulunmuştur. Artan kavurma sıcaklığı ke stan e kre ma larının b^* değ erini yükseltmiştir. Kavurma işle mi renkte sararmaya yol açmıştır.

Artan kavurma sıcaklığı ve süresi ile birlikte kre ma numunelerinin L^* değ erindeki azalma, a^* ve b^* değ erlerindeki artma eğilimi yönündeki sonuç, Wani vd. (2017) tarafından ke stan e unlarının ve Turan vd. (2015)'nin fı n d ı ğ ın kavru lması sırasında da elde edilmiştir. Gözlenen bu renk değ işi mi, yani esmer renkli bileşiklerin oluşu mu enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarının son aşamalarında meydana gelen esmer renk pigmenti melanoidinlerin (Wani vd., 2017), Maillard reaksiyonları ve hydroxymethyl furfural (Turan vd., 2015) oluşu mu ile ilişkilendirilmiştir.

Şekil 7'de kre ma numunelerine ait renklerin birbirinden ne ölçüde farklı olduğunu ifade eden ΔE^* değ erleri verilmiştir. İlgili grafikten anlaşıldığı gibi ke stan e kavurma sıcaklığı ve süresi arttıkça ΔE^* değ erleri artmaktadır. 200 °C'de kavru lan

ke stan e lerden elde edilen kre ma ların ΔE^* değ erleri arasında bir farklılık yoktur ($P>0.05$). Yine 150 °C kavru lan ke stan e lerden üretilen kre ma ların da ΔE^* değ erleri arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir ($P>0.05$). Çiğ ke stan eden üretilen kre manın rene gi 150 ve 200 °C'de kavru lan kre ma lar dan farklı bulunmuş olup, bu fark özellikle 200 °C'de kavru lan ke stan e lerden üretilen kre ma ların rene gi ile kıyaslandığında istatistik olarak önemli düzeydedir ($P<0.05$). Ancak en fazla C ve B1 numunesi arasında gözlenen 1.00 seviyesindeki ΔE^* değ eri farkının, insan gözüyle ayırt edilebilecek bir farklılık olmadığı görülmektedir (Sanz vd., 2009).

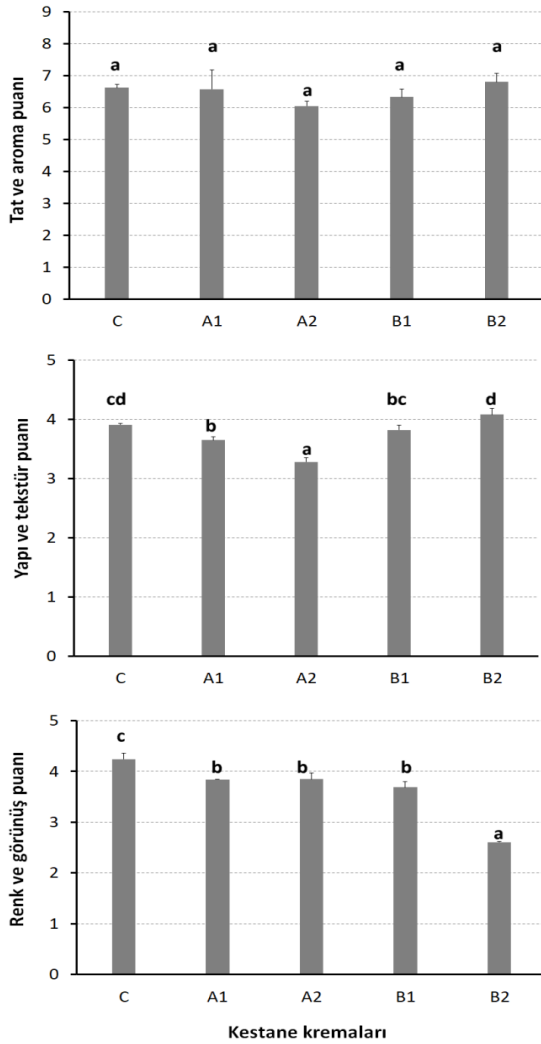


Şekil 7. Kestane kremalarına ait ΔE^* değ erleri
Figure 7. ΔE^* values of chestnut creams

Duyusal Özellikler

Kestane kremalarının duyu sal analiz sonuçları Şekil 8'de sunulmuştur. Tat ve aroma puanları yönünden numuneler arasında istatistiksel yönden bir farklılık bulunmamasına ($P>0.05$) rağmen B2 numunesi en yüksek tat ve aroma puanına sahip olmuştur. B2 numunesini çiğ ke stan eden üretilen C kre ma sı takip etmiştir. Kavurma sıcaklık ve süresinin kakaolu ke stan e kre ma sı nın tat ve aromasına etkisi olmadığı görülmüştür. Kremaların yapı ve tekstür özelliği üzerine kavurma sıcaklık ve süresinin etkili olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). 150 °C sıcaklıkta kavurma işle minin yapı ve tekstür üzerine olumsuz etkili olduğu görülmüştür. Kremalar arasında panelistlerce yapı–tekstür yönünden en çok beğ enilen numune B2 olmuştur. 200 °C'de 40 dk. kavru lan ke stan eden üretilen kre ma numunesi

daha iyi kıvamda olan ve bıçakla ekmeğe sürülme özellikleri en iyi olan numune olarak değerlendirilmiştir. Diğer numuneler daha akışkan bulunmuştur. Renk ve görünüş özellikleri bakımından kakaolu kestane kremaları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur ($P<0.05$). En çok beğenilen krema çığ kestaneden üretilen C numunesi olmuştur. Panelistler C numunesini daha parlak olarak tarif etmişlerdir. Sıcaklık süre ve derecesi yükseldikçe renk ve görünüş puanlarının düştüğü gözlemlenmiştir. Sıcaklık derecesi ve süresi arttıkça kestane kremalarının parlaklığı azalırken, bir kusur olarak algılanan ürünün yüzeyinde küçük çukurların sayısının arttığı panelistlerce fark edilmiştir.



Şekil 8. Kakaolu kestane kremalarına ait duyusal analiz puanları

Figure 8. Sensory analysis scores of cocoa chestnut creams

SONUÇ

Bu araştırmanın asıl amacı, yeni bir ürün olarak kakaolu kestane kreması geliştirmektir. Bu amaçla krema üretiminde iki farklı kestane kavurma sıcaklığı ve süresi denenmiştir. Genel olarak, panelistler üretilen kremaların duyusal açıdan "biraz iyi" ve "iyi" arasında olduğuna karar kılmışlardır. HYA, sürülebilirlik, yapışkanlık, tat-aroma ve yapı-tekstür gibi ürünün tercih edilmesindeki önemli teknolojik parametrelerin literatürdeki ticari fındık kreması örnekleriyle benzerliği göz önüne alındığında, 200 °C'de 40 dk. kavruktan üretilen kremanın ön plana çıktığı görülmektedir. Ancak bu kestane kremasının yüzeyinde meydana gelen parlaklık eksikliği veya hafif mat renk ve küçük gözenek oluşumu problemlerinin çözülmesi gerekmektedir. Bu amaçla 200 °C'nin az altında farklı (180 veya 190 °C) sıcaklıklar denenebilir. Bununla birlikte, ürünün sürülebilirlik özelliğini geliştirmek için sıvı yağa kıyasla katı yağ miktarının bir miktar artırılması fayda sağlayabilir. Ayrıca tat-aroma özelliklerini geliştirmek için ticari bir kestane aroması eklemek ürünün albenisini artırabilir.

KAYNAKLAR

- Abu-Jdayil, B., Mohameed, H., Eassa, A. (2004). Rheology of starch–milk–sugar systems: effect of heating temperature. *Carbohydr Polym*, 55: 307–314.
- Aryana, K. J., Resurreccion, A. V. A., Chinnan, M. S., & Beuchat, L. R. (2003). Functionality of palm oil as a stabilizer in peanut butter. *J Food Sci*, 68 (4): 1301–1307.
- Aydemir, O. (2019). Utilization of different oils and fats in cocoa hazelnut cream production. *J. Food Process Pres*, 43 (5): e13930.
- Blaiotta, G., Di Capua, M., Coppola, R., Aponte, M. (2012). Production of fermented chestnut purees by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 158: 195–202.
- Bozoğlu, M., Başer, U., Alhas Eroğlu, N., Kılıç Topuz, B. (2019). Developments in the Chestnut Market of Turkey. *KSÜ Tar Doğa Derg*, 22 (1): 19–25.

- De Vasconcelos, M. C. B. M., Bennett, R. N., Rosa, E. A. S., and Ferreira-Cardoso, J. V. (2010). Composition of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and association with health effects: fresh and processed products. *J Sci Food Agric*, 90: 1578–1589.
- Ertürk, Ü, Mert, C., Soylu, A. (2006). Chemical composition of fruits of some important chestnut Cultivars. *Braz Arch Biol Tech*, 49 (2): 183–188.
- FAOSTAT (2019). Food and Agriculture Organization of the United States. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Erişim tarihi: 28 Ocak 2019).
- Jitngarmkusol, S., Hongsuwankul, J., Tananuwong, K. (2008). Chemical compositions, functional properties, and microstructure of defatted macadamia flours. *Food Chem*, 110: 23–30.
- Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of protein foods. *Crit Rev Food Sci*, 1: 219–229.
- Ma, Z., Boye, J. I., Simpson, B. K., Prasher, S. O., Monpetit, D., Malcolmson, L. (2011). Thermal processing effects on the functional properties and microstructure of lentil, chickpea, and pea flours. *Food Res Int*, 44: 2534–2544.
- Sanz T., Salvador A., Baixauli R., Fiszman S. M. (2009). Evaluation of four types of resistant starch in muffins. II. Effects in texture, colour and consumer response. *Eur Food Res Technol*, 229: 197–204.
- Saraçoğlu, T. Özarslan, C., Ertan E. (2015). Kestane hasdında farklı hasat yöntemlerinin teknik ve ekonomik analizi. *Tar Mak Bil Derg*, 11 (4): 295–299.
- Turan, D., Capanoglu, E. and Altay F. (2015). Investigating the effect of roasting on functional properties of defatted hazelnut flour by response surface methodology (RSM). *LWT–Food Sci Technol*, 63: 758–765.
- Wani, I. A., Hamid, H., Hamdani, A. M., Gani, A., Ashwar, B. A. (2017). Physico–chemical, rheological and antioxidant properties of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) as affected by pan and microwave roasting. *J Adv Res*, 8: 399–405.
- Ziaolhagh, S. H., Tehrani, M. M., Razavi, S. M. A., Rashidi, H. (2017). Roasting Process Optimization of walnut kernels for the preparation of walnut cream using response surface methodology. *J Nuts*, 8 (1): 31–40.

AMOUNTS OF VITAMIN A, VITAMIN E, VITAMIN C, B-CAROTENE, LYCOPENE, GHRELIN, GLUTATHIONE, AND MDA IN FRUITS OF *DIOSPYROS KAKI L.*

**Zulaiha Gidado Mukhtar^{1,2}, Muhammad Salihu Ibrahim^{1,2},
Yusuf Ibrahim Ibrahim^{1,2}, Fikret Karatas^{1*}**

¹Firat University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Elazığ, Turkey.

²Kano State Polytechnic, School of Technology, Department of Science Laboratory Technology, Kano, Nigeria.

Received / Geliş: 02.02.2019; Accepted / Kabul: 24.06.2019; Published online / Online baskı: 11.07.2019

Mukhtar, Z. G., Ibrahim, M. S., Ibrahim, Y. I., Karatas, F. (2019). Amounts of vitamin a, vitamin e, vitamin c, β -carotene, lycopene, ghrelin, glutathione, and mda in fruits of *Diospyros kaki L.* GIDA (2019) 44(4) 585-592 doi: 10.15237/gida.GD19033

Mukhtar, Z. G., Ibrahim, M. S., Ibrahim, Y. I., Karatas, F. (2019). Trabzon hurması (*Diospyros kaki L.*) Meyvelerindeki a vitamini, e vitamini, c vitamini, beta-karoten, likopen, grelin, glutatyon ve mda miktarları. GIDA (2019) 44(4) 585-592 doi: 10.15237/gida.GD19033

ABSTRACT

In this study, the amounts of vitamins A, E, C, β -carotene, lycopene, ghrelin, reduced and oxidized form of glutathione (GSH, GSSG) with malondialdehyde (MDA) in ripe fruits of *Diospyros kaki L.* plant were determined by using HPLC. The amount of vitamins A, E, C, β -carotene, lycopene, ghrelin, GSH, GSSG and MDA in *Diospyros kaki L.* plant were found to be $0.40 \pm 0.06 - 0.92 \pm 0.08$; $0.63 \pm 0.09 - 1.34 \pm 0.14$; $47.00 \pm 0.80 - 65.61 \pm 1.56$; $2.08 \pm 0.18 - 3.36 \pm 0.30$; $0.69 \pm 0.08 - 1.42 \pm 0.13$; $2.14 \pm 0.65 - 7.98 \pm 1.06$; $398.25 \pm 34.23 - 527.90 \pm 23.36$; $23.67 \pm 8.89 - 42.43 \pm 4.81$ and $5.63 \pm 0.35 - 7.28 \pm 0.42$ $\mu\text{g/g}$, respectively. It can be said that *Diospyros kaki L.* plant fruits are a good source of vitamin C, lycopene, ghrelin and glutathione. Findings suggest that the fruit of this plant may be a useful source of antioxidants. Differences in the amount of parameters in the *Diospyros kaki L.* fruit are thought to be due to the growth medium, climate, and environmental conditions.

Keywords: *Diospyros kaki L.*, Vitamin A, Vitamin E, Vitamin C, β -carotene, Lycopene, Ghrelin, Glutathione, MDA

TRABZON HURMASI (*DIOSPYROS KAKI L.*) MEYVELERİNDEKİ A VİTAMİNİ, E VİTAMİNİ, C VİTAMİNİ, BETA-KAROTEN, LİKOPEN, GRELİN, GLUTATYON VE MDA MİKTARLARI

ÖZ

Bu çalışmada, Trabzon hurması (*Diospyros kaki L.*)'nın olgunlaşmış meyvelerinde A, E, C vitaminleri, β -karoten, likopen, ghrelin, indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon (GSH, GSSG) ve malondialdehit (MDA) miktarları Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile belirlendi. Trabzon hurması bitkisinin meyvelerindeki A vitamini, E vitamini, C vitamini, β -karoten, likopen, ghrelin, GSH, GSSG ve MDA miktarları sırasıyla $0.40 \pm 0.06 - 0.92 \pm 0.08$; $0.63 \pm 0.09 - 1.34 \pm 0.14$; $47.00 \pm 0.80 - 65.61 \pm 1.56$; $2.08 \pm 0.18 - 3.36 \pm 0.30$; $0.69 \pm 0.08 - 1.42 \pm 0.13$; $2.14 \pm 0.65 - 7.98 \pm 1.06$; $398.25 \pm 34.23 - 527.90 \pm 23.36$; $23.67 \pm 8.89 - 42.43 \pm 4.81$ $\mu\text{g/g}$ ve $5.63 \pm 0.35 - 7.28 \pm 0.42$ $\mu\text{g/g}$ arasında olduğu gözlemlendi. Trabzon hurması meyvelerinin C vitamini, likopen, ghrelin ve glutatyon bakımından iyi bir kaynak olduğu söylenebilir. Bulgular bu bitkinin meyvelerinin antioksidan için yararlı bir kaynak olabileceğini düşündürmektedir. Trabzon hurmasının meyvelerindeki parametrelerin miktarındaki farklılıkların büyüme ortamı, iklim ve çevresel koşullardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Trabzon hurması, A Vitamini, E Vitamini, C Vitamini, β -karoten, Likopen, Grelın, Glutatyon ve MDA

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ fkaratas@firat.edu.tr,

☎ (+90) 506 302 4088

☎ (+90) 424 237 0000/3682

INTRODUCTION

Fruits play a crucial role in maintaining our wellbeing which is attributable to their high content of nutrients and a bioactive compound which play valuable roles in preserving homeostasis (Manach et al., 2004; Butt et al., 2015). These compounds include amino acids, sugars, enzymes, organic acids, and phytochemicals which serve as sources of key metabolites and as biochemical markers for ripeness, flavor, essence, aroma, color, and quality (Hecke et al., 2006). Free radical species generated from cellular metabolism and by external triggers are regulated by an innate cellular antioxidant mechanism which includes enzymatic and non-enzymatic antioxidants. An equilibrium between free radicals and antioxidants is crucial for normal physiological functions (Lobo et al., 2010). If left unchecked they accumulate and react with cellular components such as lipids, proteins, and DNA, modifying them, which results in oxidative stress (Finkel and Holbrook, 2000; Melov et al., 2000). Oxidative stress leads to lipid peroxidation and a consequent decrease in membrane fluidity leading to cell death. It contributes to aging and several chronic degenerative disorders such as tumors, atherosclerosis, diabetes and Alzheimer's disease (Liguori, et al., 2018). Recent findings have shown the danger of synthetic antioxidants such as butylated hydroxyl toluene and butylated hydroxyl anisole pose to human health. Thus, researches on finding natural sources of antioxidants have been intensified in a bid to protect our bodies from the ravaging effects of free radicals (Lyun et al., 2011). *Diospyros kaki* L, belonging to *Ebenaceae* family and commonly called Persimmon is one of such fruits. It is the most extensively cultivated species of the genus *Diospyros*. Though first described in 1780, it has been exploited by the Chinese for over 2000 years, with species endemic to China, Japan, Korea, Burma, Turkey and Nepal (Petersen and Martin, 2007; Celik and Ercisli, 2008). The deciduous tree has broad leaves and produces a soft, seedless, fleshy and chewy fruit that is sweet and slightly tangy; it is best taken whole when harvested and allowed to mature and soften as the unripe fruit is astringent and bitter due to high proanthocyanidin-type tannin content (Butt et al.,

2015; Janick and Paull, 2008). The leaves and fruits of this species have been used throughout history as a remedy for cough, arteriosclerosis, hypertension, and apoplexy (Özen et al., 2004; George and Redpath, 2008). Persimmons are rich sources of trace mineral elements, antioxidants (lycopene, lutein, β - carotene, and zeaxanthin), phenolic acids, coumaric acids and water-soluble dietary fibre (Suzuki et al., 2005; Chenet al., 2008). Current researches on Persimmon plant have shown its biological importance as an antioxidant, antitumor, anti-hyperlipidemia, and antidiabetic agent (Lee et al., 2007; George and Redpath, 2008). The significance of antioxidants from natural dietary sources in the prevention of chronic degenerative diseases and preserving good health have been well established (Lee et al., 2012). Antioxidants are classified as enzymatic and non-enzymatic. Non-enzymatic low molecular-weight metabolites including ascorbic acid (AA), glutathione (GSH), alkaloids, phenolic compounds, non - protein amino acids, α -tocopherol, and β -carotene aid in offsetting the build-up of reactive oxygen species (ROS) prompted by various stresses (Mittler et al., 2004; Sarvajeet et al., 2011). These enzymes and metabolites not only protect plants and animals from cellular damage but also fine-tune the concentrations of ROS in order to optimize their functions in metabolism (Becana et al., 2010).

This research aims to assess and compare the antioxidant capacity of *Diospyros kaki* L (Persimmon) by investigating the concentration of some of its antioxidants (β -Carotene, Ascorbic acid, α -Tocopherol and Lycopene) and Glutathione (oxidised and reduced), Ghrelin and Malondialdehyde in *Diospyros kaki* L grown in three different regions of Turkey (Adiyaman, Malatya and Antalya). The comparative assessment of its nutritive components and antioxidant effect has not been well documented (Lee et al., 2012). This, therefore, serves as a viable topic for research to further establish its nutritious and economic value, and fill in the gap in the literature, where necessary.

MATERIALS AND METHODS

Materials

In the study, ripe fruits of *Diospyros kaki* L. Hachiya species, grown in Elazig, Malatya and Antalya provinces of Turkey, were used. The samples were supplied between 5-30 November 2017.

Determination of vitamin A, vitamin E, β -carotene and lycopene

3.0 g from each *Diospyros kaki* L. sample was weighed and 7.0 mL ethyl alcohol was added. The suspension was shaken well in a vortex mixer and then centrifuged for three minutes at 4500 rpm. The solution was filtered (Whatman No 1). 0.5 mL n-hexane was added to the filtrate. This way, vitamin A, vitamin E, β -carotene and lycopene were extracted to the n-hexane phase. This extraction process was replicated. The n-hexane phases were collected and dried with nitrogen gas until dryness. The residue obtained was dissolved in 0.6 mL methyl alcohol and taken up in vials of HPLC which was then ready for HPLC analysis. Supelcosil LC-18 column (25.0 cm x 4.6 mm x 5.0 μ m) was used in the determination of vitamin A, vitamin E, β -carotene and lycopene using a mixture of acetonitrile: methanol: water (63:33:4 v/v) as mobile phase. The mobile phase flow rate was set at 1.0 mL/min. The vitamin E 296 nm, vitamin A 326 nm, β -carotene 454 nm, and lycopene 474 nm were determined respectively (Catignani and Bieri, 1983; Miller et al., 1984; Ibrahim et al., 2017).

Determination of vitamin C, ghrelin, glutathione and MDA

3.0 g from each *Diospyros kaki* L. sample was weighed and 1.0 mL of 0.5 M perchloric acid was added to each homogenate, to precipitate the proteins. The mixture was placed in a vortex shaker. Each sample was made up to 6.0 mL with deionized water and centrifuged for 10 minutes at 4500 rpm. The supernatant was then filtered (Whatman No 1). The filtrate was divided into three equal portions. One portion was used for vitamin C while the others were used for ghrelin, glutathione and MDA determination. 1.0 mL filtrate taken up in vials of HPLC. Vitamin C, Ghrelin, GSH, GSSG, and MDA were

determined according to the method of Tavazi et al. (1992), Aydin et al. (2008), Dawes and Dawes (2000) and proposed by Karatas et al. (2002), respectively. Column Exsil 100-5 ODS (25 cm, 4.6 mm ID, 5 μ m) flow rate of 1.0 mL/min.

Equipment and chemicals

HPLC was performed with the SHIMADZU Prominence-I LC- 2030C 3D Model and PDA detector. All the chemical reagents used in the analysis were analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Double distilled water was used throughout the work.

Statistical Analysis

All measurements were triplicated. Mean standard deviation was determined and the results were subjected to Analysis of Variance. The SPSS 10.0 for Windows was used for variance analysis and LSD multiple comparison test was performed at $P < 0.05$ to $P < 0.005$ level.

RESULTS AND DISCUSSION

Vitamin A is essential for the normal functioning of the visual system; cellular growth and development; maintenance of epithelial cellular integrity, immune function, and reproduction (Gropper et al., 2017). The result obtained in this study showed the amount of vitamin A in *Diospyros kaki* L. fruit from Antalya, Adiyaman, and Malatya to be 0.40 ± 0.06 μ g/g, 0.92 ± 0.08 μ g/g and 0.46 ± 0.06 μ g/g, respectively. Samples from Adiyaman had the highest ($P < 0.005$) concentration of vitamin A, followed by Antalya and Malatya (Table 1). A similar study showed the Vitamin A content of *Diospyros kaki* L. fruit to be 38 RAE μ g/100g (Butt et al., 2015). Vitamin A content of fresh peach was reported as 16.3 ± 5.7 mg/kg and 18.15 ± 0.55 μ g/100g for apricots (Durst and Weaver, 2012; Kan et al., 2014) which are inconsistent with results obtained in this study.

Vitamin E is a vital compound involved in neurological and immune functions. It is an antioxidant, protecting molecules and tissues against free radicals, which contributes to the stabilization of biological membranes. In addition, it mediates in the regulation of several

enzymes (Feki et al., 2001). This study showed the vitamin E content of *Diospyros kaki* L. from Antalya, Adiyaman, and Malatya to be 0.63 ± 0.09 $\mu\text{g/g}$, 0.81 ± 0.10 $\mu\text{g/g}$ and 1.34 ± 0.14 $\mu\text{g/g}$, respectively. Based on these values the vitamin E content of *Diospyros kaki* L. from Malatya is higher ($P < 0.005$) than that of Adiyaman and Antalya (Table 1). The amount of vitamin E investigated in ripe *Ziziphus mauritiana* Lam (Ber fruit) was reported to have the concentrations of

37109.31 $\mu\text{g/g}$ and 29261.99 $\mu\text{g/g}$ for ripe and over ripe fruit respectively (de Souza, 2008). Vitamin E concentration of irrigated cultivar of *Prunus armeniaca* L. (apricot) was found to be 37.60 ± 0.40 $\mu\text{g}/100$ g (Kan et al., 2014). The amount of vitamin E in *Prunus armeniaca* and *Ziziphus mauritiana* Lam are much higher than that of *Diospyros kaki* L. based on the result of this study.

Table 1. Some parameters in *Diospyros kaki* L. specimens from three different provinces

Parameters	1. Antalya	2. Adiyaman	3. Malatya
Vitamin A ($\mu\text{g/g}$)	0.40 ± 0.06	0.92 ± 0.08	0.46 ± 0.06
Vitamin E ($\mu\text{g/g}$)	0.63 ± 0.09	0.81 ± 0.10	1.34 ± 0.14
Vitamin C ($\mu\text{g/g}$)	65.61 ± 1.56	47.00 ± 0.80	49.20 ± 2.93
β -Carotene ($\mu\text{g/g}$)	2.08 ± 0.18	3.36 ± 0.30	2.60 ± 0.24
Lycopene ($\mu\text{g/g}$)	0.69 ± 0.08	1.42 ± 0.13	1.10 ± 0.10
Ghrelin ($\mu\text{g/g}$)	2.28 ± 0.50	2.14 ± 0.65	7.98 ± 1.06
Reduced glutathione ($\mu\text{g/g}$)	398.25 ± 34.23	444.96 ± 31.55	527.90 ± 23.36
Oxidized glutathione ($\mu\text{g/g}$)	23.67 ± 8.89	42.43 ± 4.81	28.43 ± 3.77
Reduced glutathione / Oxidized glutathione	16.83	10.49	18.57
Malondialdehyde ($\mu\text{g/g}$)	5.75 ± 0.27	7.28 ± 0.42	5.63 ± 0.35

The strong reducing properties of vitamin C make it a potent antioxidant. It neutralizes superoxide and hydroxyl radicals protecting cells from oxidative damage (Aksoy, 2000). It is required for collagen formation, absorption of inorganic iron, reduction of plasma cholesterol level, inhibition of nitrosamine formation, and enhancement of the immune system. Vitamin C is also necessary for the prevention of scurvy and maintenance of healthy skin, gums, and blood vessels and is reported to reduce the risk of arteriosclerosis, cardiovascular diseases and some forms of cancer (Lee and Kader, 2000).

This study showed the vitamin C content of *Diospyros kaki* L. from Antalya, Adiyaman, and Malatya to be 65.61 ± 1.56 $\mu\text{g/g}$, 47.00 ± 0.80 $\mu\text{g/g}$ and 49.20 ± 2.93 $\mu\text{g/g}$, respectively, with the highest concentration ($P < 0.005$) seen in Antalya followed by Malatya then Adiyaman (Table 1). A previous study obtained 110 mg/100g of vitamin C in fresh persimmon; 75 mg/100 g in orange, 10.6 mg/100 g in fresh tomatoes and 34 mg/100 g in mandarins (Lee and Kader, 2000). In a similar

research vitamin C content in papaya fruits was found to range between 110 to 1340 $\mu\text{g/g}$ in five different species of pulp puree (de Souza, 2008) while the vitamin C content in apricot was 20.75 mg/100 g and 12 mg/100 g in fresh apple (Rasanuet et al., 2005). Our findings are consistent with the literature.

β -Carotene sometimes referred to as pro-vitamin A, is a precursor of vitamin A. It is the light yellow or orange pigment found in plants which are converted to vitamin A in intestinal epithelial and is mainly stored in the liver and skin (Hamilton et al., 2014). β -carotene is a potent antioxidant known to exhibit photoprotective effects and anticancer activity (Madhunapantula and Robertson, 2012).

This study showed the β -carotene content of *Diospyros kaki* L. from Antalya, Adiyaman and Malatya to be 2.08 ± 0.18 $\mu\text{g/g}$, 3.36 ± 0.30 $\mu\text{g/g}$, and 2.60 ± 0.24 $\mu\text{g/g}$, respectively, (Table 1). The results showed the β -carotene concentration to be higher ($P < 0.05$) in *Diospyros kaki* L. fruit from

Adiyaman, followed by Malatya then Antalya. The concentration of β -carotene content in fresh papaya pulp was shown to range from 0.19 ± 0.07 mg/100 g to 0.56 ± 0.09 mg/100 g (de Souza, 2008). The β -carotene content of three cultivars of *Prunus armeniaca* L. (apricot) was reported as $0.88 \mu\text{g/g}$ in fruits of Hacıhaliloğlu, $2.20 \mu\text{g/g}$ in fruits of the cultivar Tokaloğlu and $2.62 \mu\text{g/g}$ in fruits of the cultivar 'Kabaasi' apricots, respectively (Kan et al., 2014). The result of this study shows that the concentration of β -carotene in *Diospyros kaki* L. to be much higher than that of papaya, however, the findings are in consistent with Hacıhaliloğlu' and 'Tokaloğlu' cultivars of *Prunus armeniaca* L.

Lycopene, a non-provitamin A carotenoid, possesses antioxidant, detoxifying, signaling and chemo-preventive properties (Wang, 2012). Its antioxidant activity is enhanced by its ability to sequester singlet oxygen and its ability to trap peroxy radicals (Basuny et al., 2009). This study showed the lycopene content of *Diospyros kaki* L. in increasing order of concentration to be, $1.42 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$, $1.10 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$, and $0.69 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$, from Adiyaman, Malatya, and Antalya, respectively (Table 1). From the result, the highest lycopene concentration ($P < 0.05$) in *Diospyros kaki* L. fruit is seen in Adiyaman, followed by Malatya then Antalya.

In similar research, the lycopene content in fresh papaya fruits ranged from 1.44 ± 0.28 mg/100 g to 3.39 ± 0.32 mg/100 g (de Souza, 2008). The lycopene content in *Solanum lycopersicum* (tomato) was reported to be $0.2 \mu\text{g/g}$ (Dewanto et al., 2002), which is inconsistent with values obtained in this study.

The gastrointestinal neuro-peptide hormone ghrelin, secreted by ghrelinergic cells in the stomach and pancreas stimulates growth hormone (GH) release from the pituitary gland. It acts on the brain to regulate food intake, body weight, adiposity, and glucose metabolism modulation of stress and anxiety. It also protects against muscle atrophy and improves cardiovascular functions such as vasodilatation and cardiac contractility (Müller et al., 2015).

This study shows the ghrelin content of *Diospyros kaki* L. from Antalya, Adiyaman, and Malatya to be $2.28 \pm 0.50 \mu\text{g/g}$, $2.14 \pm 0.65 \mu\text{g/g}$ and $7.98 \pm 1.06 \mu\text{g/g}$, respectively. The ghrelin content of fruits from Malatya was the highest ($P < 0.005$) followed by that of Antalya then Adiyaman (Table 1). The ghrelin content of *C. laevigata* from Elazığ, Adiyaman, and Malatya to be $67.67 \pm 6.16 \mu\text{g/g}$, $18.96 \pm 6.73 \mu\text{g/g}$ and $79.96 \pm 12.14 \mu\text{g/g}$, respectively. The ghrelin content of fruit from Malatya was higher followed by that of Elazığ, then Adiyaman (Ibrahim et al., 2017). Our findings are much lower than those of *C. laevigata*.

Glutathione is required for a lot of cellular activities including the protection of cells of the immune system, brain, kidneys, eyes, liver, heart, lungs and skin tissues against oxidative damage. The reduced form of glutathione (GSH), is the most important intracellular antioxidant molecule. GSH has many functions such as the detoxification of xenobiotics, the transport of amino acids, and the reduction of sulfhydryl groups in proteins. In particular, glutathione is the most important metabolite against oxidative stresses in plants and it is found in almost all cells of plants (Esterbauer et al., 1992).

This study revealed the content of GSH in *Diospyros kaki* L. to be $398.25 \pm 34.23 \mu\text{g/g}$, $444.96 \pm 31.55 \mu\text{g/g}$ and $527.90 \pm 23.36 \mu\text{g/g}$ while the GSSG content was found to be $23.67 \pm 8.89 \mu\text{g/g}$, $42.43 \pm 4.81 \mu\text{g/g}$ and $28.43 \pm 3.77 \mu\text{g/g}$ from Antalya, Adiyaman and Malatya, respectively. The results showed the GSH concentration to be higher ($P < 0.05$) in *Diospyros kaki* L. fruit from Malatya, followed by Adiyaman then Antalya. However, the GSH/GSSG ratio was found to be 16.83, 10.49 and 18.57. The GSH content of *Diospyros kaki* L. from Malatya had the highest ($P < 0.05$) concentration followed by Adiyaman then that of Antalya. On the other hand, the GSSG content of Adiyaman is higher followed by that of Malatya, then Antalya (Table 1).

The level of glutathione in *Musa paradisiaca* L. (plantain) was reported to be $54.10 \pm 0.60 \mu\text{g/g}$ (Agoreyo et al., 2017). The amount of reduced

glutathione in mango has been found to be 159.1 $\mu\text{mol/g}$ (AbdAllatif et al., 2015). The amount of total glutathione content in ripe ber (*Ziziphus mauritiana Lam*) fruit was also found to be 6598.2 $\mu\text{mol/g}$ (Kumar et al., 2011). Our findings are inconsistent with the literature.

Free radicals affect lipid peroxidation by acting on unsaturated fatty acids in the membranes. The resulting lipid peroxides break down rapidly to form reactive carbon compounds one of which is MDA (Gawel et al., 2004). In this study, the MDA content of *Diospyros kaki L.* from Antalya, Adiyaman, and Malatya was found to be $5.75 \pm 0.27 \mu\text{g/g}$, $7.28 \pm 0.42 \mu\text{g/g}$ and $5.63 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$ respectively. The MDA content of *Diospyros kaki L.* from Adiyaman was higher ($P < 0.05$) followed by that of Antalya then Malatya. The amount of MDA in ripe ber (*Ziziphus mauritiana Lam*) fruit was found to be 4.498 nmol/g (Kumar et al., 2011). The amount of MDA in red ripe tomato fruit was found to be 2.3 nmol/g (Mondal et al., 2004).

CONCLUSION

Based on the results obtained from this research, the variation in values obtained from one region to another may be due to differences in environmental factors like geographical location, soil, temperature, altitude, and pre/post-harvest treatments. These dynamics affect the biochemistry of the plants and hence its concentration of bioactive compounds (Liu et al., 2015). The outcomes of this research on the levels of these biomolecules show it to be a rich source of vitamins C, β -carotene; glutathione, lycopene, and ghrelin. We can say that *Diospyros kaki L.* fruit can be a very good source of some antioxidants that are very important in protecting the body against the dangerous effect of free radicals that lead to aging and degenerative diseases such as diabetes and cancer. Its nutritional value can be of optimal importance to the food industry where its antioxidant value can be used and optimized in order to satisfy a wide variety of consumer preference.

REFERENCES

AbdAllatif, A.M., El Kheshin, M.A., Rashedy, A.A. (2015). Antioxidant Potential of some

Mango (*Mangifera indica L.*) Cultivars Growing under Salinity Stress. *Egyptian J Horticulture*. 42(2): 654-665.

Agoreyo, B.O., Agoreyo, F.O., Omigie, M.I. (2017). Antioxidant activity, phytochemical and antioxidant levels of *musa paradisiaca* l and *mus asapiantum* l at various ripening stages. *Eur Food Res Technol*. 5: 41-59.

Aksoy, M. (2000). *Beslenme Biyokimyası*. Hatipoğlu Basım ve Yayım San. Tic. Ltd. Şti., 321-342, 564-565s, Ankara.

Aydin, S., Karatas, F., Geckil, H. (2008). Simultaneous quantification of acylated and desacylated ghrelin in biological fluids. *Biomed Chromatog*. 22: 1354-1349.

Basuny, A.M., Gaafar, A.M., Arafat, S.M. (2009). Tomato lycopene is a natural antioxidant and can alleviate hypercholesterolemia. *Afr J Biotechnol*. 8(23): 6627-6633.

Becana, M., Matamoros, M.A., Udvardi, M., Dalton, D.A. (2010). Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist*. 188: 960-976.

Butt, M.S., Sultan, M.T., Aziz, M., Naz A., Ahmed, W., Kumar, N., Imran, M. (2015). Persimmon (*Diospyros kaki*) fruit: hidden phytochemicals and health claims. *Exp Clin Sci (EXCLI Journal)*. 14: 542-61.

Catignani, G.L., Bieri, J.G. (1983). Simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in serum or plasma by liquid chromatography. *Clin Chem*. 29: 708-712.

Celik, A., Ercisli, S. (2008). Persimmon cv. Hachiya (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit: some physical, chemical and nutritional properties. *Int J Food Sci Nutr*. 59(7-8): 599-606.

Chen, X.N., Fan, J.F., Yue. X., Wu, X.R., Li, L.T. (2008). Radical scavenging activity and phenolic compounds in persimmon (*Diospyros kaki L.* cv. Mopan). *J Food Sci*. 73: 24-28.

Dawes, P., Dawes, E. (2000). *SGE Chromatography Products Catalog*. p.182.

de Souza, L.M. (2008). L-ascorbic acid, β -carotene and lycopene content in papaya fruits (*carica*

- papaya) with or without physiological skin freckles. *Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)*. 65(3): 246-250.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Rui Hai Liu, R.H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem*. 50(10): 3010–3014.
- Dursta, R.W., Weaver, G.W. (2012). Nutritional content of fresh and canned peaches. *J Sci Food Agric*. (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.5849.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürgens, G. (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 13: 341-390.
- Feki, M., Souissi M., Mebazaa, A. (2001). Vitamin E: structure, metabolism, and functions. *Annales de Medecine Interne (Paris)*. 152(6): 384-389.
- Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239-247.
- Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P. (2004). Malondialdehyde as lipid peroxidation marker. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland)*. 57 (9-10): 453-455.
- George, A.P., Redpath S. (2008). Health and medicinal benefits of persimmon fruit: A review. *Adv Horti Sci*. 22: 244–249.
- Gropper, S.S., Jack L. Smith, J.L. (2017). Advanced Nutrition and Human Metabolism. *Cengage Learning US Pub*. 2017, 7th ed. ISBN 9781305627857.
- Hamilton, C., Aidukaitis, L., Liu, P., Robison, R., O'Neill, K. (2014). Dietary Antioxidants in Prostate Cancer in Cancer. *Oxid Stress Dietary Antioxidants*. p.183-190 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405205-5.00017-9>.
- Hecke, K., Herbinger, K., Veberic, R., Toplak, H., Stampar, F., Keppel, H., Grill, D. (2006). Sugar-, acid-, and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. *Eur J Clin Nutr*. 60: 1136–1140.
- Ibrahim, M.S., Ibrahim, Y.I., Mukhtar, Z.G., Karatas, F. (2017). Amount of Vitamin A, Vitamin E, Vitamin C, Malondialdehyde, Glutathione, Ghrelin, Beta-Carotene, Lycopene in Fruits of Hawthorn, Midland (*Crataegus laevigata*). *J Hum Nutr Food Sci*. 5(3): 1112.
- Janick, J., Paull, R.E. (2008). The encyclopedia of fruit & nuts, Wallingford, UK: CABI Publishing, p. 327. ISBN 978-0-85199-638-7
- Kan, T., Gundogdu, M., Ercisli, S., Muradoglu, F., Celik, F., Gecer, M.K., Kodad, O., Zia-Ul-Haq, M. (2014). Phenolic compounds and vitamins in wild and cultivated apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruits grown in irrigated and dry farming conditions. *Biol Res*. 47(1): 46.
- Karatas, F., Karatepe, M., Baysar, A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 311: 76-79.
- Kumar, S., Yadav, P., Jain, V., Malhotra S.P. (2011). Oxidative Stress and Antioxidative System in Ripening Ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.) Fruits. *Food Technol Biotechnol*. 49(4): 453-459.
- Lee, J.H., Lee, Y.B., Seo, W.D., Kang, S.T., Lim, J.W., Cho, K.M. (2012). Comparative Studies of Antioxidant Activities and Nutritional Constituents of Persimmon Juice (*Diospyros kaki* L. cv. Gapjubaekmok). *Prev Nutr Food Sci*. 17(2): 141–151.
- Lee, S.K., Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crop. *Postharvest Biol Technol*. 20(3): 207-220.
- Lee, Y., Cho, E., Tanaka, T., Yokozawa, T. (2007). Inhibitory activities of proanthocyanidins from persimmon against oxidative stress and digestive enzymes related to diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol*. 53: 287–292.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., and Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 13: 757–772..

- Liu, W., Liu, J., Yin, D., Zhao, X. (2015). Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. *Plos One*. 10(4): 1-22.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 4(8): 118-126.
- Lyun, S., Jianbao, Z., Xiaoyun, L., Liyu, Z., Yali, Z. (2011). Evaluation of the antioxidant activity of total flavonoid sextract from persimmon (*D. kaki* L.) leaves. *Food chemtoxis*. 49: 2689-2696.
- Madhunapantula, S.R.V., Robertson, G.P. (2012). Current Challenges in Personalized Cancer. *Med Adv Pharmacol*. 65: 361-398.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 79: 727-47.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., Lithgow, G.J. (2000). Extension of life-span with süper oxide dismutase/catalas emimetics. *Sci*. 289(5484): 1567-1569.
- Miller, K.W., Lorr, N.A., Yang, C.S. (1984). Simultaneous determination of plasma retinol, alpha-tocopherol, lycopene, alpha-carotene, and beta-carotene by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 138: 340-345.
- Mittler, R., Van der Auwera, S., Gollery, M., Van, F.B. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*. 9: 490-498.
- Mondal, K., Sharma, N.S., Malhotra, S.P., Dhawan, K., Singh, R. (2004). Antioxidant systems in ripening tomato fruits. *Biologia Plantarum*. 48: 49-53.
- Müller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., Casanueva, F.F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter A., Ghigo E., Cole P.A., Cowley M., Cummings D.E., Tschöp, M.H. (2015). Ghrelin. *Mol Metab*. 4(6): 437-460.
- Özen, A., Colack, A., Dincer, B., Güner, S. (2004). A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyroskaki* L. Ebenaceae). *Food Chem*. 85: 431-437.
- Petersen, C., Martin, A. (2007). General Crop Information: Persimmon. University of Hawaii, Extension Entomology & UH-CTAHR Integrated Pest Management Program. Retrieved 2007-01-15.
- Rasanu, N., Magearu, V., Nicoleta Matei, N., Soceanu, A. (2005). Determination of vitamin C in different stages of Fruits Growth. *Analele UniversităŃii din București – Chimie, Anul XIV (serie nouă), I-II, p. 167-172. Analele UniversităŃii din București*.
- Sarvajeet, S.G., Khan, N.A., Anjum, N.A., Tuteja, N. (2011). Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: Morphological, physiological and biochemical aspects. *Plant Stress*. 5: 1-23.
- Suzuki, T., Someya, S.H.F., Tanokura, M. (2005). Rapid communication. Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*). *Food Chem*. 93: 149-152.
- Tavazzi, B., Lazzarino, G., Di-Pierro, D., Giardina, B. (1992). Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the perfusion of the isolated post ischemic rat heart. *Free Radic Biol Med*. 13: 75-78.
- Wang, X.D. (2012). Lycopene metabolism and its biological significance. *Am J Clin Nutr*. 96(5): 1214-1222.

KIRMIZI PANCAR SUYU ÜRETİMİNDE ENZİM ÖN UYGULAMASI: İŞLEM KOŞULLARININ MEYVE SUYU VERİMİ, BETANİN MİKTARI, TOPLAM FENOLİK MADDE VE ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÜZERİNE ETKİSİ

**Esra Gençdağ, Ahmet Görgüç, Merve Birişik,
Ezgi Genç, Ceren Başkurt, Fatih Mehmet Yılmaz***

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Aydın, Türkiye

Geliş / *Received*: 07.03.2019; Kabul / *Accepted*: 24.06.2019; Online baskı / *Published online*: 11.07.2019

Gençdağ, E., Görgüç, A., Birişik, M., Genç, E., Başkurt, C., Yılmaz, F. M. (2019). Kırmızı pancar suyu üretiminde enzim ön uygulaması: İşlem koşullarının meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerine etkisi. *GIDA* (2019) 44(4) 593-604 doi: 10.15237/gida.GD19053

Gençdağ, E., Görgüç, A., Birişik, M., Genç, E., Başkurt, C., Yılmaz, F. M. (2019). *Enzymatic pre-treatment in red beet juice production: The effect of process variables on juice yield, betanin content, total phenolic compound and antioxidant capacity. GIDA* (2019) 44(4) 593-604 doi: 10.15237/gida.GD19053

ÖZ

Kırmızı pancar, gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan doğal renk maddesi olan betaninin en önemli kaynağıdır. Konsantre ya da toz formda arz edilen bu gıda renklendiricisi için ilk üretim basamağı kırmızı pancar suyu üretimidir. Bu çalışmanın amacı, yüksek verimlilikte kırmızı pancar suyu eldesinde presleme öncesi enzim ön uygulamasının ve bu işlemde ortam pH değeri, sıcaklığı, enzim oranı ve sürenin etkilerinin belirlenmesidir. Bu kapsamda, ilk aşamada farklı pH (2.5-5.0) ve sıcaklık (30-60 °C) değerlerinde enzim ilavesinin (Pectinex Ultra SP-L) etkileri değerlendirilmiş; ikinci aşamada enzim oranı ve işlem süresinin etkileri yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak belirlenmiştir. Enzim ön uygulaması sonrasında pres veriminin %17 arttığı bulunmuştur. Optimum koşullar olan 3.0 pH değeri, 50 °C sıcaklık, 75.8 poligalakturonaz birimi (PGB)/g enzim oranı ve 48 dk.'lık işlem süresi sonunda meyve suyu verimi %34.7, betanin miktarı 106.0 mg/100 g, toplam fenolik madde miktarı 245.2 mg GAE/100 g, antioksidan kapasite değeri ise 47.0 µmol TE/100 g olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kırmızı pancar, enzimatik işlem, meyve suyu verimi, betanin, fenolik madde, antioksidan kapasite

ENZYMATIC PRE-TREATMENT IN RED BEET JUICE PRODUCTION: THE EFFECT OF PROCESS VARIABLES ON JUICE YIELD, BETANIN CONTENT, TOTAL PHENOLIC COMPOUND AND ANTIOXIDANT CAPACITY

ABSTRACT

Red beet is the most important source of betanin, a natural colorant commonly used in the food industry. The first production step for this food colorant presented in concentrated or powder form is the production of red beet juice. The aim of this study is to determine the effect of enzyme pre-treatment prior to pressing step in the production of high-yield red beet juice and, that of pH, temperature, enzyme ratio and processing time. In this context, the effect of enzyme addition (Pectinex Ultra SP-L) were evaluated at different pH values (2.5-5.0) and temperature (30-60 °C); and in the second step, the effects of the enzyme ratio and processing time were determined using the response surface methodology (RSM). Enzyme pre-treatment increased press yield by 17%. Under the optimum conditions which are 3.0 pH value, 50 °C temperature, 75.8 polygalacturonase unit (PGB)/g enzyme ratio and 48 min processing time, the fruit juice yield was 34.7%, the betanin content was 106.0 mg/100 g, the total phenolic content was 245.2 mg GAE/100 g and the antioxidant capacity was determined as 47.0 µmol TE/100 g.

Keywords: Red beet, enzymatic treatment, juice yield, betanin, phenolic compound, antioxidant capacity

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ fatih.yilmaz@adu.edu.tr

☎ (+90) 256 213 7503

☎ (+90) 256 213 6686

GİRİŞ

Gıda formülasyonlarında kullanılan sentetik renk maddelerinin sağlık üzerine olası zararlı etkileri nedeniyle doğal gıda renklendiricilerin kullanımına olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Turp vd., 2016; Gasztonyi vd., 2001). Kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.), doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılan betalain pigmentlerine sahiptir (Ravichandran vd., 2013; Özcan ve Ersus, 2018). Betalainler suda çözünebilir ve azot içeren betalainik asit türevi doğal pigmentlerdir. Doğal kırmızı renk verici betalainlerin ana kaynağı kırmızı pancar köküdür (Tekin vd., 2018). Betalainler, pancar suyu konsantresi veya pancar suyu tozu şeklinde gıda, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde doğal katkı maddesi olarak kullanılabilir (Kaya ve Baysal, 2016). Betalainlerin serbest radikal temizleyici etkileri ile oksidatif stresle ilişkili hastalıklara karşı koruma sağladığı (Gliszczynska-Swiglo, 2006); çok yüksek dozlarda (5 g/kg vücut ağırlığı) dahi toksik etki göstermediği bildirilmektedir (Wiczowski vd., 2018). Betalainlerin E-162 kodu ile doğal gıda boyası olarak kullanımı Avrupa Birliği tarafından onaylanmıştır (Kaya ve Baysal, 2016).

Kırmızı pancarın doğal pigmenti olan betalainler, betasiyaninler (kırmızı-mor pigmentler) ve betaksantinler (sarı-turuncu pigmentler) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Cardoso-Ugarte vd., 2014). Antosiyaninler en yaygın kullanılan doğal pigmentler olmasına rağmen, betalainler pH ve sıcaklık değişimlerinde çok daha stabildir. Betalain pigmentlerinin stabilitesi; içeriğinde bulunduğu ürünün sıcaklığına, ısl işlem süresine, ortam pH değerine ve su aktivitesine bağlıdır (Nemzer vd., 2011).

Meyve suyu üretiminde pres verimini artırmak, hücre içerisinden maddelerin pres suyuna geçmesini sağlamak amacıyla çok çeşitli enzimler kullanılmaktadır (Sandri vd., 2011). Kırmızı pancardan betalainlerin elde edilmesinde enzim destekli ekstraksiyon yöntemleri, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine karşı alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır (Puri vd., 2012). Pektinaz, selüloz ve hemiselüloz gibi enzimler, hücre duvarını yıkmak ve meyve suyu ekstraksiyon verimini arttırmak için meyve suyu endüstrisinde

yaygın olarak kullanılmaktadır. Kırmızı pancar dokusu, birçok sebzenin aksine pektin makromoleküllerini arabinoz aracılığıyla çapraz bağlayan ve bunları hücre çeperine tutturmak için kullanılan ferulik asidi içermektedir (Zhao vd., 2008). Yüksek ferulik asit içeriğine sahip kırmızı pancar hücre duvarının sıkı hücresel yapısı nedeniyle ekstraksiyon işleminde ek bir basamak olarak enzim uygulaması gerekli görülmektedir (Fissore vd., 2012). Kırmızı pancarın bu özel morfolojik yapısından dolayı optimum enzimatik işlem koşullarının oluşturulması oldukça önemlidir (Dongowski, 2001).

Bu çalışmada, kırmızı pancardan doğal renk maddesi üretiminde ilk aşama olan meyve suyu prosesinde poligalakturonaz, hemiselüloz, selüloz, proteaz ve amilaz karışımı 'miks' ticari enzim olan Pectinex Ultra SP-L kullanımının meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite değerleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca, pH, sıcaklık, enzim oranı ve süre değişkenleri ele alınarak optimum işlem parametreleri belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.) yerel marketten temin edilmiş ve işlemlere dek +4 °C'de bekletilmiştir. İşlemlerde ve analizlerde kullanılan sitrik asit Smart Kimya Ltd. Şti. (Türkiye)'den, trifloroasetik asit, sodyum hidroksit, Folin-Ciocalteu ayracı, sodyum karbonat ve LC saflıkta su Merck (Almanya)'ten; betanin, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), gallik asit, troloks ve LC saflıkta asetonitril ise Sigma-Aldrich (ABD)'ten temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan Pectinex Ultra SP-L enzimi Novozymes (Danimarka) tarafından sağlanmıştır.

Kırmızı pancarın ve tampon çözeltilerinin işlemlere hazırlanması

Kırmızı pancar ilk olarak sap ve gövdesinden ayrılmış, yıkanmış ve kabukları soyulmuştur. Ardından sebzenin lifli yapısı göz önünde bulundurularak tüm parçaların homojen olması sağlanacak şekilde doğrama ve rendeleme işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlemlerde kullanılan 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 pH değerlerine sahip farklı

çözeltilerin hazırlanmasında gerekli sitrik asit konsantrasyonları sırasıyla 2.00, 1.45, 0.83, 0.49, 0.37, 0.25 g/L olarak ön çalışma ile belirlenmiş ve çözeltiler günlük hazırlanmıştır.

Kırmızı pancar suyu üretiminde pH değerinin ve sıcaklığın etkilerinin belirlenmesi

Bu aşamada presleme öncesi enzimli ve enzim kullanılmadan işlemler uygulanmış ve her iki koşulda farklı pH değerlerinin (2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ve 5.0) ve sıcaklıkların (30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C) etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Bu kapsamda deney planına göre taze hazırlanmış 100 mL sitrik asit çözeltisi kapaklı cam şişe içerisinde öncelikle su banyosunda deney sıcaklığına ulaşmaya kadar ısıtılmış, ardından sırasıyla gram örnek başına 95 PGB enzim (Enzim ilaveli plan için) ve 50 g parçalanmış kırmızı pancar şişelere aktarılmıştır. Şişeler, çalkalamalı su banyosunda 60 dk. süre boyunca bekletilmiş, ardından 30 ± 2 °C'ye soğutulmuş ve pres kalıbı (325 kg/m²) ile süzme bezi kullanılarak kırmızı pancar suyu elde edilmiştir. Elde edilen meyve suları ile önce meyve suyu verimi belirlenmiş; daha sonra diğer analizler için numuneler -20 °C'de saklanmıştır.

Kırmızı pancar suyu üretiminde enzim oranının ve işlem süresinin etkilerinin belirlenmesi

Kırmızı pancardan enzimatik işlemle meyve suyu eldesinde enzim oranının ve işlem süresinin etkileri yanıt yüzey metodu (Response surface methodology, RSM) kullanılarak merkezi tümleşik dizayn (Central composite design, CCD) ile incelenmiş ve ayrıca optimum enzimatik işlem koşulları da belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin alt ve üst limitleri (Enzim oranı: 21.3 - 85.1 PGB/g; süre: 5 - 55 dk.) ön denemeler ile belirlenmiş; ortam pH değeri ve sıcaklığı bir önceki deneysel veriler dikkate alınarak sabit tutulmuştur. Üçü merkez nokta olmak üzere 11 deneyden oluşan deneysel tasarımın bağımlı değişkenleri meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite olmuştur. Çalkalamalı su banyosunda gerçekleştirilen işlemlerin sonunda uygulanan presleme ve filtrasyonun ardından meyve suyu

elde edilmiştir. Elde edilen meyve suları ile önce meyve suyu verimi belirlenmiş; daha sonra diğer analizler için numuneler -20 °C'de saklanmıştır.

Analizler

Meyve suyu verimi

Presleme ve filtrasyon sonunda elde edilen meyve sularının ağırlığı (m_1), işlemlerde kullanılan çözelti miktarı (m_2) ve kırmızı pancar ağırlığı ($m_0 = 50$ g) kullanılarak aşağıdaki bağıntıyla meyve suyu verimi (MSV) hesaplanmıştır (Khandere vd., 2011):

$$\text{MSV (\%)} = [(m_1 - m_2)/m_0] \times 100$$

Betanin miktarının belirlenmesi

Kırmızı pancar sularında betanin miktarı HPLC metodu ile belirlenmiştir (Güneşer, 2016). Öncelikle elde edilen meyve suları 0.45 µm PVDF filtreden geçirilerek HPLC (Shimadzu Prominence LC20A)'ye enjekte edilmek üzere viallere aktarılmıştır. UV dedektör (Shimadzu SPD-20A) ve ters faz C18 kolonun (250 mm x 4.60 mm x 5 µm) kullanıldığı çalışmada izokratik mobil faz %0.5 trifloroasetik asit çözeltisi ve asetonitril 90:10 (v:v) olmuştur. Analiz 540 nm'de, 1 mL/dk. akış hızında ve 20 °C kolon sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Betanin standardı kullanılarak tanımlama ve miktar analizi yapılmış ve sonuçlar mg/100 g olarak hesaplanmıştır.

Toplam fenolik madde

Toplam fenolik madde analizi, spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Kırmızı pancar suyundan 30 µL alınıp, 2.37 mL deiyonize su ve 150 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ile oda sıcaklığında karıştırılmış ve karanlıkta 8 dk. bekletilmiştir. Ardından 450 µL doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenmiş ve vorteksenerek karıştırılmıştır. Etüvde 40 °C sıcaklıkta 30 dk. bekletilen karışımın 750 nm dalga boyundaki absorbans değeri UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu V-1800, Japonya) ile ölçülmüştür. Standart kalibrasyon eğrisi oluşturmak için farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri (50 – 500 mg/L) kullanılmış ve analiz aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, 'mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g' olarak hesaplanmıştır (Yılmaz ve Ersus Bilek, 2018).

Antioksidan kapasite

Antioksidan kapasite DPPH yöntemi ile belirlenmiştir (Kim vd., 2002). Öncelikle 0.1 mL meyve suyu üzerine 2.9 mL 0.1 mM etanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi eklenip çalkalanmış ve oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dk. bekletilmiştir. Ardından absorbans değeri, 517 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu V-1800, Japonya) ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi, örnek yerine farklı konsantrasyonlarda troloks kullanılarak, aynı analiz koşullarının gerçekleştirilmesi ile elde edilmiştir. Sonuçlar 'µmol Troloks eşdeğeri (TE)/100 g örnek' cinsinden ifade edilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} x_i x_j$$

Burada Y tahmin edilen bağımlı değişken; X_i ve X_j , Y değerini etkileyen bağımsız değişkenler ($i \neq j$); β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} sırasıyla kesişim, doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayılarıdır; k ise değişken sayısını ifade etmektedir.

Modelin doğruluğu, programın ANOVA çıktıları olan uyum eksikliği (lack of fit), uyum katsayısı (R^2) ve Fisher test değerine (F -değeri) göre değerlendirilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

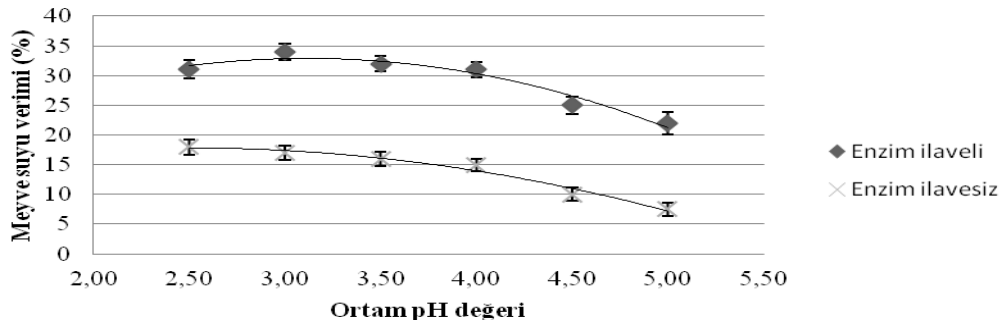
pH değeri ve sıcaklığın meyve suyu verimine etkileri

Bu çalışmanın ilk aşamasında, presleme öncesi enzim ön uygulamasında enzim aktivitesini doğrudan etkileyen parametreler olan ortam pH

İstatistiki analiz

Verilerin istatistiki değerlendirilmesi SPSS paket programı (SPSS 7.0, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilerde, sonuçlar üzerine parametrelerin etkisi varyans analizi (ANOVA) ile tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Optimizasyon, Design-Expert (Design-Expert 7.0, USA) istatistik programı kullanılarak yanıt yüzey metodu (Response Surface Methodology, RSM) uygulanarak yapılmıştır. Deneysel veriler ikinci derece polinom modeline örtüştürülmüş ve regresyon katsayıları çoklu doğrusal regresyon ile elde edilmiştir:

değeri ve sıcaklığın etkileri incelenmiştir. Bu kapsamda farklı pH ve sıcaklıklarda uygulamalar gerçekleştirilmiş; ayrıca karşılaştırma yapmak amacıyla enzim ilavesiz işlemler de aynı koşullarda değerlendirilmiştir. Ortam pH değeri ve sıcaklığı çarpan etki olarak hem enzim aktivitesini hem de ekstraksiyon koşullarını doğrudan etkilediğinden meyve suyu verimi baz alınarak bu şekilde bir karşılaştırma yapılmıştır. Enzim ilavesiz ön uygulamada, ortam pH değerinin artması ile, yani alkali koşullara yaklaştıkça pres veriminin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 1). pH değeri'nin 2.5'ten 5.0'e yükselmesiyle meyve suyu verimi %17'den %7'ye düşmüştür. pH değerinin düşmesi yani asitliğin artması ile bitki hücre yapısı daha kolay parçalanmakta ve dolayısıyla pres verimi artmaktadır (Demir vd., 2004).

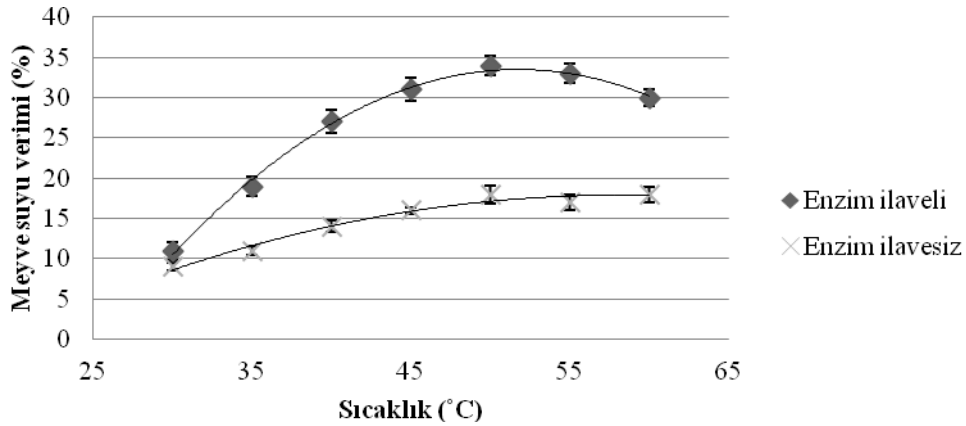


Şekil 1. Farklı pH değerlerinde enzimatik ve enzimatik olmayan işlemlerin meyve suyu verimi üzerine etkisi ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$)

Figure 1. Effect of enzymatic and non-enzymatic treatments on fruit juice yield at different pH values ($T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$)

Aynı çalışma koşullarında enzim ilavesi (Pectinex Ultra SP-L) ile gerçekleştirilen işlemlerde ise verimin %17.5'ten %34.5'e yükseldiği belirlenmiştir. Enzim ilavesiz uygulamaya kıyasla enzim aktivitesinin pH değerine bağlı olarak değişmesi pres veriminin asidik koşullardan etkilendiğini göstermiştir. pH değerinin 2.5'ten 3.0'e yükselmesiyle pres veriminin arttığı ve bu pH değerinde en yüksek değerin elde edildiği tespit edilmiştir. pH 3.0 değerinden alkali ortama yaklaştıkça ise tıpkı enzim ilavesiz işlemlerde olduğu gibi pres veriminin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Burada hem artan pH değerinin enzim aktivitesini düşürmesi hem de alkali koşulların ekstraksiyon verimini azaltması verim düşüşünün nedenleri olarak gösterilebilir (Belwal

vd., 2016; Li vd., 2018); ancak enzim ön uygulaması tüm pH değerlerinde enzim ilavesizlere kıyasla yüksek pres verimi sağlamıştır. Enzim ön uygulamasıyla pres veriminin artması, bitki hücre duvarında bulunan selüloz - hemiselüloz - pektik madde kompleksinin ticari miks enzim olan 'Pectinex Ultra SP-L' katalizöründe parçalanmasından kaynaklanmaktadır (Khandare vd., 2011). Her ne kadar Pectinex Ultra SP-L enziminin aktif pH çalışma aralığının 4 ila 9 arasında olduğu rapor edilmiş olsa da (Anonim, 2015); bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre kırmızı pancardan en yüksek meyve suyu veriminin elde edildiği pH değerinin 3.0 olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2. Farklı sıcaklıklarda enzimatik ve enzimatik olmayan işlemlerin meyve suyu verimi üzerine etkisi (pH: 3.0)

Figure 2. Effect of enzymatic and non-enzymatic treatments on fruit juice yield at different temperatures (pH: 3.0)

Çalışmanın ilk aşamasında farklı pH değerlerinin etkilerinin incelenip optimum pH değeri (pH 3.0) belirlendikten sonra pH değerinin 3.0 olduğu koşulda farklı sıcaklıkların pres verimine etkisi incelenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, enzim ilavesiz işlemde sıcaklığın artışıyla başlangıçta pres veriminin çok hızlı arttığı, 50 °C ve üzerinde verim artışının sabitlendiği anlaşılmaktadır (Şekil 2). Enzim ilavesiz 30 °C sıcaklıkta %9 pres verimi elde edilirken; 60 °C'de verim %18 olmuştur. Kırmızı pancardan meyve suyu üretiminde enzim ön uygulamasında sıcaklığın etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Enzim ilavesi ve sıcaklığın yükselmesi ile meyve suyu veriminin

belirli bir noktaya kadar (30 - 50 °C) arttığı, sıcaklığın daha da yükselmesi ile (55, 60 °C) verimde belirgin bir azalma olduğu bulgulanmıştır. 30 °C sıcaklıkta 95 PGB/g enzim ön uygulaması sonucu %11 pres verimi sağlanırken; aynı koşulda 50 °C'de pres verimi %34.7 olarak belirlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda protein denatürasyonu sonucu enzim aktivitesi azalmakta ve böylece pres verimi de azalmaktadır (Sagu vd., 2014). Enzim ön uygulamasının tüm sıcaklık değerlerinde pres verimini enzim ilavesiz (kontrol) işlemlere kıyasla artırdığı; en yüksek pres veriminin de 50 °C'de enzim ön uygulamasının gerçekleştirildiği işleme ait olduğu tespit

edilmiştir. Literatür incelendiğinde, farklı bitki materyalleri için optimum enzimatik işlem sıcaklığının bitki ve kullanılan enzim çeşidine bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır. Pitayadan Pectinex Ultra SP-L enziminin kullanıldığı çalışmada 40 °C (Truong vd., 2016), kayısı ve armuttan Pektinaz enzimi ile 40 °C (Joshi vd., 2011), kakuleden Celluclast 1.5 L enzimi ile 45 °C, şeker otundan selüloz enzimi ile 50 °C; pektinaz ile 45 °C; hemiselüloz ile 60 °C (Puri vd., 2012) en uygun sıcaklıklar olarak tespit edilmiştir. Pectinex Ultra SP-L'nin kullanıldığı diğer çalışmalarda ise yeşilbiberde 50 °C (Baby ve Ranganathan, 2016a), kakulede 50 °C (Baby ve Ranganathan, 2016b), malay elmasında 30 °C (Minh vd., 2014) en uygun sıcaklık dereceleri olarak rapor edilmiştir.

Enzim konsantrasyonu ve işlem süresinin etkileri

Çalışma kapsamında, kırmızı pancarda presleme öncesi enzim ön uygulaması için optimum pH değeri ve sıcaklığın belirlenmesinin ardından farklı enzim konsantrasyonu ve sürelerde gerçekleştirilen enzimatik işlemlerin meyve suyu verimi, betanin miktarı, TFM (Toplam fenolik madde) miktarı ve TEAK (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) üzerindeki etkileri yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile değerlendirilmiştir. Üçü merkez noktası olmak üzere 11 deney gerçekleştirilmiş; sonuçlar Çizelge 1'de sunulmuştur. Enzim oranı 21.3 - 85.1 PGB/g ve 5 - 55 dk. uygulama süresi aralığındaki sonuçlar incelendiğinde, meyve suyu veriminin %28.8 ile %34.4; betanin miktarının 71.3 ile 108.2 mg/100 g; TFM miktarının 102.8 ile 245.1 mg GAE/100 g; TEAK değerinin ise 27.4 ile 46.6 µmol TE/100 g arasında değiştiği görülmektedir.

Çizelge 1. Pectinex Ultra SP-L enziminin etkisini belirlemede kullanılan merkezi tümleşik tasarım ve analizler sonucu elde edilen bağımlı değişkenlere ait değerler

Table 1. Central composite design used to determine the effect of Pectinex Ultra SP-L enzyme and obtained results belonging to depended variables

Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>			Bağımlı değişkenler <i>Dependent variables</i>			
Deney No*	Enzim oranı (PGB/g)**	Süre (dk.)	Meyve suyu verimi (%)	Betanin (mg/100 g)	TFM (mg GAE/100 g)	TEAK (µmol TE/100 g)
<i>Experiment No*</i>	<i>Enzyme ratio (PGB/g)**</i>	<i>Time (min)</i>	<i>Juice yield (%)</i>	<i>Betanin (mg/100 g)</i>	<i>TFM (mg GAE/100 g)</i>	<i>TEAK (µmol TE/100 g)</i>
1	53.2	5	28.8	79.2	102.8	30.9
2	75.8	48	34.5	108.2	245.1	46.6
3	75.8	12	30.6	78.6	182.4	33.1
4	30.6	12	29.1	71.3	100.9	27.4
5	53.2	30	32.7	92.4	225.4	35.6
6	53.2	55	34.4	103.2	235.4	44.7
7	30.6	48	32.8	91.5	210.6	36.8
8	53.2	30	33.0	90.2	218.9	40.1
9	53.2	30	33.3	89.7	213.1	37.3
10	85.1	30	33.6	93.1	239.9	42.8
11	21.3	30	30.7	86.4	185.1	30.8

*Harmanlanmış sıra

**PGB: Poligalakturonaz birimi

*Randomized order

**PGB: Polygalacturonase unit

Varyans analizi (ANOVA) sonuçları ve modellerin regresyon katsayıları Çizelge 2’de sunulmuştur. Bağımsız değişkenlerin değişen güven aralıklarıyla tüm bağımlı değişkenler üzerinde önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Regresyon modeli tarafından belirlenen toplam değişkenlerin oranını temsil eden uyum katsayısı (R^2) (Afshar ve Baniasadi, 2018) değerleri, meyve suyu verimi, betanin miktarı, TFM ve TEAK değerleri için sırasıyla 0.9922, 0.9282, 0.9860 ve 0.9594 olarak belirlenmiştir. R^2 değerlerinin 1’e yakın değerler olması (Lee ve ark, 2006) ve yüksek Fisher test değerleri (F - değeri) modellerin verileri yeterince temsil ettiğini göstermektedir.

Çizelge 2 incelendiğinde, enzim oranı ve sürenin meyve suyu verimi üzerindeki etkileri istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0.001$). Bu parametrelerin ikinci derece etkilerine bakıldığında meyve suyu verimi üzerindeki negatif etkileşimi istatistiki açıdan anlamlı olduğu belirlenmiştir ($P < 0.01$). Enzim oranının artması ile birlikte bitki hücre duvarı daha kolay parçalanmakta böylece meyve suyu verimi artmaktadır. Enzim oranı belirli bir değerin üzerine çıktığında pres verimi artış hızında azalma

gözlenmiştir. Bunun nedeni enzimin etki edebileceği substrat miktarının azalması veya enzimlerin degrade olması sonucunda verimde düşüş meydana getirmesidir (Baby ve Ranganathan, 2016a). Enzim oranı ($P < 0.05$) ve sürenin ($P < 0.001$) betanin miktarı üzerindeki etkileri istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Enzim oranı ve uygulama süresinin artması ile beraber kırmızı pancarda betanin miktarının arttığı görülmüştür. Enzim oranı ve sürenin ($P < 0.001$) TFM miktarı üzerindeki etkileri ile beraber bu parametrelerin negatif yönlü etkisi ($P < 0.05$) ve sürenin ikinci dereceden negatif etkisi ($P < 0.001$) istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Kırmızı pancardaki yüksek antioksidan kapasite değerinin içermiş olduğu betalain pigmentlerinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (Kanner vd., 2001; Mikolajczyk-Bator ve Czapski, 2017). TEAK değeri üzerindeki enzim oranı ($P < 0.01$) ve sürenin ($P < 0.001$) etkisi istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur. Bir modelin deneysel veriler için uygunluğunu gösteren uyum eksikliği (lack of fit) testine göre, tüm bağımlı değişkenlerin uyum eksikliği, istatistiki açıdan önemsiz ($P > 0.05$) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2. Pectinex Ultra SP-L uygulamasının yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları

Table 2. Statistical analysis results and model coefficients belonging to response surface methodology (RSM) of Pectinex Ultra SP-L treatment

Model parametreleri <i>Model parameters</i>	Katsayı <i>Coefficient</i>	Meyve suyu verimi <i>Juice yield</i>	Betanin <i>Betanin</i>	TFM <i>TFM</i>	TEAK <i>TEAK</i>
Kesişim / <i>Intercept</i>	β_0	23.13***	63.89**	-64.45***	18.07**
Doğrusal / <i>Linear</i>					
Enzim oranı, A / <i>Enzyme ratio, A</i>	β_1	0.13***	0.27*	2.96***	0.26**
Süre, B / <i>Time, B</i>	β_2	0.24***	0.38***	9.21***	0.22***
Etkileşimli / <i>Interaction</i>					
A x B	β_{12}	1.19x10 ⁻⁴	5.86x10 ⁻³	-0.03*	2.55x10 ⁻³
İkinci derece / <i>Second order</i>					
A ²	β_{11}	-9.03x10 ^{-4**}	-2.48x10 ⁻³	-9.46x10 ⁻³	-1.50x10 ⁻³
B ²	β_{22}	-2.30x10 ^{-3**}	-1.70x10 ⁻³	-0.08***	-8.6x10 ⁻⁴
R^2		0.9922	0.9282	0.9860	0.9594
Ayarlanmış R^2 / <i>Adjusted R²</i>		0.9844	0.8563	0.9720	0.9187
p-değeri / <i>p-value</i>		<0.0001	0.0069	0.0001	0.0017
F-değeri / <i>F-value</i>		126.81	12.92	70.31	23.61
Uyum eksikliği / <i>Lack of fit</i>		0.7026	0.0784	0.2944	0.8070

Önem düzeyleri: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001

Model denklemi: $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}(Ax B) + \beta_{13}(Ax C) + \beta_{23}(Bx C) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2$

Significance level: *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001

Model equation: $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}(Ax B) + \beta_{13}(Ax C) + \beta_{23}(Bx C) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2$

Bağımsız değişkenlerin meyve suyu verimi, betanin miktarı, TFM miktarı ve TEAK değeri üzerine etkileri Şekil 3'te sunulmuştur. Enzim oranının artışı ile birlikte bağımlı değişken değerlerinin de belli noktaya kadar artış gösterdiği, ardından sabitlendiği gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde enzim oranının farklı meyve ve sebzelerde pres verimini etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Sin vd., 2006; Aliaa vd., 2010; Minh, 2014; Aydın vd., 2018). Bu nedenle yüksek meyve suyu verimi elde edebilmek için kullanılan enzim oranının belirlenmesi oldukça önemlidir.

Şekil 3 incelendiğinde, bağımsız değişkenlerden uygulama süresinin artışı ile birlikte meyve suyu verimi ve TFM miktarında artış sağlandığı, belirli bir noktadan sonra ise sabitlenmenin gerçekleştiği belirlenmiştir. Enzimler biyolojik katalizörler olup meyve hücre duvarlarını parçalamak için uygun temas sürelerine ihtiyaç duymaktadır. Enzim ön uygulamasında aynı enzim oranlarında uygulama süreleri karşılaştırıldığında süre artışıyla beraber meyve suyu veriminde de artış gözlenmiştir. Literatür incelendiğinde, farklı bitki materyalleri için enzimatik işlem süresinin bitki ve kullanılan enzim çeşidine bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır. Dut meyvesinde Pectinex Ultra SP-L ile 120 dk.; Viscozyme L ile 180 dk. (Nguyen ve Nguyen, 2018), narda selüloz ile 88 dk. (Li vd., 2018), beyaz pitayada Pectinex Ultra SP-L ile 40 dk. (Aliaa vd., 2010), muzda pektinaz ile 80 dk. (Lee vd., 2006) sürelerde optimum verim sağlanmıştır.

Kırmızı pancarda enzim ön uygulamasında, enzim oranı ve uygulama süresinin artması ile birlikte betanin miktarının da arttığı belirlenmiştir (Şekil 3). Literatür incelendiğinde, bitkilerden çeşitli renk maddelerinin kazanımı üzerinde kullanılan enzim çeşidinin etkili olduğu rapor edilmiştir (Santamaria vd., 2000; Landbo ve Meyer, 2001; Barzana vd., 2002; Lee ve Wrolstad, 2004).

Kırmızı pancarda TFM miktarının enzim oranı ve uygulama süresi interaksyonundan etkilendiği belirlenmiştir. Enzim oranı ve sürenin artmasıyla TFM miktarında artış tespit edilmiştir (Şekil 3). Benzer çalışmalar incelendiğinde bitki çeşidine

bağlı olarak enzimatik uygulamalarda enzim oranı ve işlem süresinin TFM miktarı üzerinde etkili oldukları bulgulanmıştır. Frenk üzümü ve yaban mersininde Pectinex Ultra SP-L'nin enzim ilavesiz kontrol örneğine kıyasla TFM miktarını %26 (Buchert ve ark, 2005), kırmızı havuçta pektinazın %27 (Khandare ve ark, 2011), siyah frenk üzümünde Pectinex Ultra SP-L'nin %36 (Landbo ve Meyer, 2004) oranında arttırdığı rapor edilmiştir.

Mevcut çalışmada enzim ön uygulamasında ayrı ayrı enzim oranı ve süre parametrelerinin TEAK değeri üzerindeki etkileri istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Literatürle kıyaslandığında artan enzim oranı ve işlem süresinin çeşitli bitkilerde pres verimi ile beraber antioksidan kapasite üzerinde de önemli değişiklikler meydana getirdiği görülmektedir. Hünnap bitkisinde %20 pektinaz ve Viscozyme L uygulaması ile antioksidan kapasite değerinin 14.8'den 20.9 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 'ye yükseldiği bildirilmiştir (Koley vd., 2011). Ayrıca, siyah havuçta %0.2 pektinaz ile 30 $\mu\text{mol TE}/\text{mL}$ (Khandare vd., 2011); kırmızı biberde %0.3 Viscozyme L ile 341.6 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$, %0.3 pektinaz ile 294.5 $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$ TEAK değerleri (Nath vd., 2016) elde edildiği rapor edilmiştir.

Optimizasyon ve verifikasyon

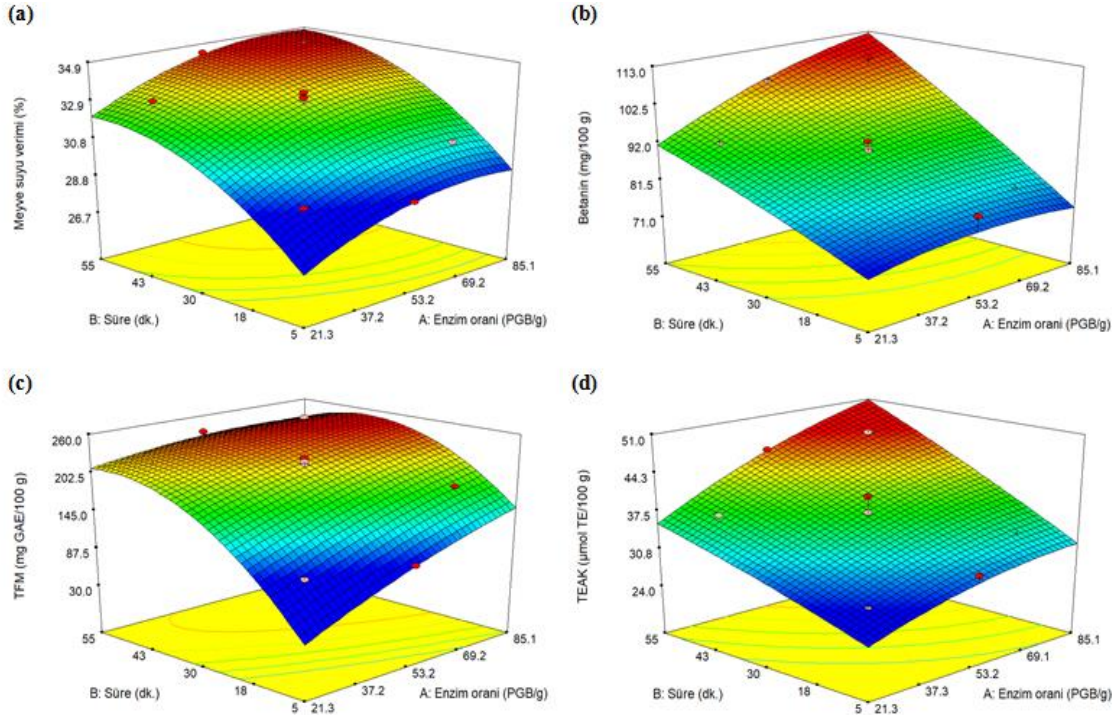
Optimum işlem koşullarına ait parametreler belirlenirken, kırmızı pancardan en yüksek meyve suyu verimi, betanin miktarı, TFM miktarı ve TEAK değerlerine ulaşılması amaçlanmıştır. Çizelge 3 incelendiğinde, optimum çalışma koşulları 75.8 PGB/g enzim konsantrasyonu ve 48 dk. uygulama süresi olarak belirlenmiştir. Optimum işlem koşulları için güvenilirlik değeri ile veriler karşılaştırıldığında sonuçlar arasında istatistiki açıdan farklılığın bulunmadığı ($P > 0.05$) tespit edilmiştir.

Kırmızı pancarda presleme öncesi Pectinex Ultra SP-L kullanımının meyve suyu verimini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Bu kapsamda, belirlenen optimum pH (3.0) ve sıcaklık (50 °C) değerlerinde farklı enzim oranı ve işlem sürelerinin presleme verimi üzerine olan etkileri RSM ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, gıda

Enzim ön uygulamasının kırmızı pancar suyu verimine etkisi

endüstrisinde meyve suyu üretiminde enzimatik ön işlem uygulamasının verime olan etkisinin yanı sıra ürünün diğer kalite özelliklerine olan etkilerinin (briks, viskozite, bulanıklık vb.) de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Aynı

zamanda farklı meyve suyu üretim proseslerinde kullanılan meyvenin çeşidi ve hücre yapısı göz önünde bulundurularak her bir enzim için optimum çalışma koşullarının belirlenmesi önem arz etmektedir.



Şekil 3. Pectinex Ultra SP-L uygulamasına ait bağımsız değişkenlerin meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde (TFM) ve antioksidan kapasite (TEAK) üzerine etkileri
Figure 3. The effects of independent variables belonging Pectinex Ultra SP-L treatment on the fruit juice yield, betanin content, total phenolic compound (TPC) and antioxidant capacity (TEAC) values

Çizelge 3. Pectinex Ultra SP-L ile işlemede en yüksek meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde (TFM) miktarı ve antioksidan kapasite (TEAK) değeri için optimum işlem koşulları
Table 3. Optimum processing conditions for highest fruit juice yield, betanin content, total phenolic compound (TPC) and antioxidant capacity (TEAC) values in treatment with Pectinex Ultra SP-L

Pectinex Ultra SP-L İşlem Parametreleri <i>Pectinex Ultra SP-L Process Parameters</i>			Parametre <i>Parameter</i>	Program çıktısı <i>Program output</i>	Deneysel sonuç <i>Experimental result</i>
Enzim oranı (PGB/g)* <i>Enzyme ratio</i> (PGB/g)*	İşlem süresi (dk.) <i>Process time</i> (min)	Güvenilirlik <i>Desirability</i>			
75.8	48	0.984	Meyve suyu verimi (%) <i>Juice yield (%)</i>	34.7	34.4 ± 0.7
			Betanin (mg/100g)	106.0	104.3 ± 4.9
			TFM (mg 6AE/100g)	245.2	238.3 ± 9.1
			TEAK (µmol TE/100g)	47.0	46.7 ± 3.0

*PGB: Poligalakturonaz birimi

*PGB: Polygalacturonase unit

TEŞEKKÜR

Çalışmaya maddi destek sağlayan TÜBİTAK – BİDEB (2209 - A)ʼe yazarlar olarak teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

Afshar, S., Baniasadi, H. (2018). Investigation the effect of graphene oxide and gelatin/starch weight ratio on the properties of starch/gelatin/GO nanocomposite films: The RSM study. *Int J Biol Macromol*, 109, 1019-1028.

Anonymous (2015). Pectinex Ultra SP-L safety data sheet. Novozymes Corp., Denmark.

Aydın, E., Sarıkaya, Ö., Çatalkaya, G., Kahveci, D. (2018). Enzim ön uygulamasının siyah üzüm ve ahududu sularının fiziksel ve kimyasal özellikleri, toplam fenolik madde içeriği ve toplam antioksidan kapasitesi üzerine etkisi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 22(4), 502-512.

Baby, K. C., Ranganathan, T. V. (2016a). Effect of enzyme pretreatment on yield and quality of fresh green chilli (*Capsicum annum L*) oleoresin and its major capsaicinoids. *Biocatal Agric Biotechnol*, 7, 95-101.

Baby, K. C., Ranganathan, T. V. (2016b). Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum maton.*) volatile oil. *Ind Crops Prod*, 89, 200-206.

Barzana, E., Rubio, D., Santamaria, R. I., Garcia-Correa, O., Garcia, F., Ridaura Sanz, V. E., López-Munguía, A. (2002). Enzyme-mediated solvent extraction of carotenoids from marigold flower (*Tagetes erecta*). *J Agric Food Chem*, 50(16), 4491-4496.

Belwal, T., Dhyani, P., Bhatt, I. D., Rawal, R. S., Pande, V. (2016). Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). *Food Chem*, 207, 115-124.

Buchert, J., Koponen, J. M., Suutarinen, M., Mustranta, A., Lille, M., Törrönen, R., Poutanen, K. (2005). Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices. *J Sci Food Agric*, 85(15), 2548-2556.

Cardoso-Ugarte, G.A., Sosa-Morales, M.E., Ballard, T., Liceaga, A., San Martín-González, M.F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*). *LWT-Food Sci Technol*, 59(1), 276-282.

Demir, N., Acar, J., Bahçeci, K. S. (2004). Effects of storage on quality of carrot juices produced with lactofermentation and acidification. *Eur Food Res Technol*, 218(5), 465-468.

Dongowski, G. (2001). Enzymatic degradation studies of pectin and cellulose from red beets. *Nahrung*, 45(5), 324-331.

Fissore, E. N., Rojas, A. M., Gerschenson, L. N. (2012). Rheological performance of pectin-enriched products isolated from red beet (*Beta vulgaris L. var. conditiva*) through alkaline and enzymatic treatments. *Food Hydrocoll*, 26(1), 249-260.

Gasztonyi, M. N., Daood, H., Hajos, M. T., Biacs, P. (2001). Comparison of red beet (*Beta vulgaris var conditiva*) varieties on the basis of their pigment components. *J Sci Food Agric*, 81(9), 932-933.

Gliszczynska-Swiglo, 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.

Güneşer, O. (2016). Pigment and color stability of beetroot betalains in cow milk during thermal treatment. *Food Chem*, 196, 220-227.

Joshi, V. K., Parmar, M., Rana, N. (2011). Purification and characterization of pectinase produced from apple pomace and evaluation of its efficacy in fruit juice extraction and clarification. *Indian J Nat Prod Resour*, 2(2), 189-197.

Kanner, J., Harel, S., Granit, R. (2001). Betalains a new class of dietary cationized antioxidants. *J Agric Food Chem*, 49(11), 5178-5185.

Kaya, G., Baysal, T. (2016). Production of fermented red beet juice powder by using spray and drum drier. *GIDA*, 41(5), 305-310.

Khandare, V., Walia, S., Singh, M., Kaur, C. (2011). Black carrot (*Daucus carota ssp. sativus*) juice:

- processing effects on antioxidant composition and color. *Food Bioprod Process*, 89(4), 482-486.
- Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem*, 50(13), 3713-3717.
- Koley, T. K., Walia, S., Nath, P., Awasthi, O. P., Kaur, C. (2011). Nutraceutical composition of *Zizyphus mauritiana Lamk* (Indian ber): effect of enzyme-assisted processing. *Int J Food Sci Nutr*, 62(3), 276-279.
- Landbo, A. K., Meyer, A. S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J Agric Food Chem*, 49(7), 3169-3177.
- Landbo, A. K., Meyer, A. S. (2004). Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement of anthocyanins and other phenolics in black currant juice. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 5(4), 503-513.
- Lee, J., Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *J Food Sci*, 69(7), 564-573.
- Lee, W. C., Yusof, S., Hamid, N. S. A., Baharin, B. S. (2006). Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *J Food Eng*, 73(1), 55-63.
- Li, Y., Zhu, C. P., Zhai, X. C., Zhang, Y., Duan, Z., Sun, J. R. (2018). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from pomegranate peel by response surface methodology and their anti-oxidant potential. *CHM*, 10(4), 416-423.
- Mikolajczyk-Bator, K., Czapski, J. (2017). Effect of pH changes on antioxidant capacity and the content of betalain pigments during the heating of a solution of red beet betalains. *Pol J Food Nutr Sci*, 67(2), 123-128.
- Minh, N. P. (2014). Enzymatic pectinase application in extraction and purification of juice turbidity from red rose apple pulp (*Syzygium malaccensis*). *Int J Multidiscip Res Dev*, 1(4), 45-51.
- Nath, P., Kaur, C., Rudra, S. G., Varghese, E. (2016). Enzyme-assisted extraction of carotenoid-rich extract from red capsicum (*Capsicum annum*). *Agric Res*, 5(2), 193-204.
- Nemzer, B., Pietrzowski, Z., Sporna, A., Stalica, P., Thresher, W., Michalowski, T., Wybraniec, S. (2011). Betalainic and nutritional profiles of pigment-enriched red beet root (*Beta vulgaris* L.) dried extracts. *Food Chem*, 127(1), 42-53.
- Nguyen, C., Nguyen, H. (2018). The quality of mulberry juice as affected by enzyme treatments. *Beverages*, 4(2), 41.
- Nur 'Aliaa, A. R., Siti Mazlina, M. K., Taip, F. S., Liew Abdullah, A. G. (2010). Response surface optimization for clarification of white pitaya juice using a commercial enzyme. *J Food Process Eng*, 33(2), 333-347.
- Özcan, K., Bilek, S. E. (2018). Kırmızı Pancardan Renk Maddesi Üretimi ve Stabilesinin Sağlanması. *Academic Food Journal*, 16(4), 439-449.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol*, 30(1), 37-44.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J., Tiwary, A. K. (2012). Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chem*, 132(3), 1113-1120.
- Ravichandran, K., Saw, N. M. M. T., Mohdaly, A. A., Gabr, A.M., Kastell, A., Riedel, H., Smetanska, I. (2013). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Res Int*, 50(2), 670-675.
- Sagu, S. T., Nso, E. J., Karmakar, S., De, S. (2014). Optimisation of low temperature extraction of banana juice using commercial pectinase. *Food Chem*, 151, 182-190.
- Sandri, I. G., Fontana, R. C., Barfknecht, D. M., da Silveira, M. M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT-Food Sci Technol*, 44(10), 2217-2222.
- Santamaria, R. I., Reyes-Duarte, M. D., Barzana, E., Fernando, D., Gama, F. M., Mota, M., Lopez-Munguia, A. (2000). Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from

chili guajillo puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. *J Agric Food Chem*, 48(7), 3063-3067.

Sin, H. N., Yusof, S., Hamid, N. S. A., Rahman, R. A. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. *J Food Eng*, 73(4), 313-319.

Tekin, E., Türe, H., Barutçu, İ. (2018). Sıcaklık, askorbik asit ve pH'nın kırmızı pancar (*Beta vulgaris* L.) betasiyaninlerinin bozunma kinetiği üzerine etkilerinin incelenmesi. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, 23(2), 217-232.

Truong, N. M., Dang, Q. T. (2016). Application of hydrolytic enzymes for improvement of red dragon fruit juice processing. *Asia Pacific J Sus Agri Food Energy*, 4(1), 1-4.

Turp, G., Kazan, H., Ünübol, H. (2016). Sosis Üretiminde Doğal Renk Maddesi ve Antioksidan

Olarak Kırmızı Pancar Tozu Kullanımı. *CBU J of Sci*, 12(2), 303-311.

Wiczowski, W., Romaszko, E., Szawara-Nowak, D., Piskula, M. K. (2018). The impact of the matrix of red beet products and interindividual variability on betacyanins bioavailability in humans. *Food Res Int*, 108, 530-538.

Yılmaz, F. M., Bilek, S. E. (2018). Ultrasound-assisted vacuum impregnation on the fortification of fresh-cut apple with calcium and black carrot phenolics. *Ultrason Sonochem*, 48, 509-516.

Zhao, Z., Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem*, 109(4), 691-702.



FARKLI YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN KAMKAT (*FORTUNELLA MARGARITA* Swing.) TOZLARININ FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Demet Yıldız Turgut*, Orçun Çınar, Tuba Seçmen
Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya, Türkiye

Geliş / Received: 12.12.2018; Kabul / Accepted: 13.06.2019; Online baskı / Published online: 11.07.2019

Yıldız-Turgut, D., Çınar, O., Seçmen, T. (2019). Farklı yöntemlerle elde edilen kamkat (*Fortunella Margarita* Swing.) tozlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44(4) 605-617 doi:10.15237/gida.GD18118

Yıldız-Turgut, D., Çınar, O., Seçmen, T. (2019). Determination of functional properties of kumquat (*Fortunella Margarita* Swing.) powders obtained by different methods. *GIDA* (2019) 44(4) 605-617 doi:10.15237/gida.GD18118

ÖZ

Bu çalışmada farklı yöntemlerle elde edilen kamkat tozlarının fonksiyonel kalite parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, %10 maltodekstrin ilavesi ve maltodekstrinsiz olarak sıcak hava ile kurutma ve dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen kamkat tozu örneklerinde toplam fenolik madde, flavonoid, karotenoid miktarı, askorbik asit, antioksidan aktivite ve flavonoid bileşen analizleri gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde, flavonoid ve karotenoid miktarı, antioksidan aktivite ve flavonoid kompozisyonu açısından en yüksek değerler maltodekstrinsiz dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen toz örneğinde tespit edilmiştir. En yüksek askorbik asit içeriği ise %10 maltodekstrin ilaveli dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen toz örneğinde belirlenmiştir. Maltodekstrin ilavesinin sıcak hava kurutma yönteminde flavonoid bileşenlerin miktarını olumlu etkilediği gözlenmiştir. Elde edilen kamkat tozlarının çeşitli gıda ürünlerinde duyu ve fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesinde katkı maddesi olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kamkat (*Fortunella margarita* Swing.), meyve tozu, kurutma, antioksidan, flavonoid

DETERMINATION OF FUNCTIONAL PROPERTIES OF KUMQUAT (*FORTUNELLA MARGARITA* Swing.) POWDERS OBTAINED BY DIFFERENT METHODS

ABSTRACT

In this study, determination of the functional quality parameters of kumquat powders obtained by different methods was aimed. For this purpose, total phenolic content, total flavonoid content, total carotenoid content, ascorbic acid, antioxidant activity and flavonoid composition analyses were performed in kumquat powder samples obtained by hot air and freeze drying methods with 10% maltodextrin and without maltodextrin. The highest values in terms of total phenolic, flavonoid, and carotenoid contents, antioxidant activity and flavonoid compositions were detected in the powder sample obtained by freeze drying method without maltodextrin. The highest ascorbic acid content was determined in the powder sample obtained by freeze drying method with 10% maltodextrin. It was observed that the flavonoid composition was positively affected by the addition of maltodextrin in hot air drying method. As a result, the obtained kumquat powders can be used as additives in various food products for improving sensorial and functional properties.

Keywords: Kumquat (*Fortunella margarita* Swing.), fruit powder, drying, antioxidant, flavonoid

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author;

✉ demet.yildizturgut@tarimorman.gov.tr

☎ (+90)242 321 6797

☎ (+90)242 321 1512

GİRİŞ

Turunçgillerin küçük mücevheri olarak nitelendirilen kamkat, (*Fortunella* spp.) subtropik bir iklim bitkisidir. Kamkatın anavatanı Doğu Asya ve Çin olup, yaygın olarak Çin, Japonya ve Amerika'da yetiştiriciliği yapılmaktadır. Avustralya, Güney Afrika, Porto Riko, Guatemala, Kolombiya, Brezilya ve Hindistan'da ise daha küçük ölçekte yetiştirilmektedir. Hong Kong (*F. Hindsii* Swing.), Marumi (*F. japonica* Swing., syn. *Citrus maduremis* Lour.), Meiwa (*F. crassifolia* Swing.) ve Nagami (*F. margarita* Swing.) en yaygın kamkat çeşitleri olarak bilinmektedir (Morton, 1987).

Kamkat meyvesi taze tüketiminin yanında şekerleme, reçel, marmelat, likör, şarap, kurutulmuş şekilde meyve çayı olarak da değerlendirilmekte, kabuğunda bulunan uçucu yağlar kozmetik, ilaç ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Choi, 2005; Gölükcü vd., 2011; Wang vd., 2012). Kamkat, askorbik asit, karotenoidler, uçucu yağlar ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşenlerce zengin bir meyvedir (Schirra vd., 2008; Agócs vd., 2007; Wang vd., 2007; Peng vd., 2013; Jayaprakasha vd., 2012). İçeriğindeki bu bileşenlerin sağlık üzerine olumlu etkileri ile ilgili çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir. Kamkat ekstraktlarının içeriğindeki rutin, narirutin, ponsirin, apigenin 8-C-rutinosid, 3',5', di-C- β -glukopiranozilfloretilin (DGPP), β -karoten ve uçucu bileşenler gibi fitokimyasalların etkisiyle prostat kanser hücrelerinin çoğalmasında in vitro ortamda engellediği bildirilmiştir (Jayaprakasha vd., 2012). Lien vd. (2009), kamkat kabuk ekstraktlarının kandaki LDL, triaçilgliserit ve lipit seviyelerini azalttığını rapor etmişlerdir. Kamkat kabuğu uçucu yağının bileşiminde yer alan alkoller, ketonlar, asitler ve esterlerin, meyvenin karakteristik tat ve aromasına katkıda bulunmasının yanı sıra insan sağlığına da yararlı etkileri olduğu ifade edilmiştir (Schirra vd., 2008). Uzak Doğu ülkelerinde kurutulmuş kamkatın öksürük, boğaz ağrısı, ses kısıklığı gibi solunum yolu hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir (Chiu ve Chang, 1998; Lien vd., 2009; Lou vd., 2015).

Meyve tozları, raf ömürlerinin uzun olması, her mevsimde tüketilebilmeleri, depolama ve ambalajlamadaki kolaylıkları, düşük taşıma maliyetleri, mikrobiyolojik stabilite ve farklı gıda formülasyonlarında kullanılabilimleri gibi birçok avantaja sahiptir. Meyve tozları, gıda endüstrisinde yoğurt, süt, kek, puding, reçel, marmelat gibi gıdalarda, duyuşal ve fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesi amacıyla yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Ergüney, 2013; Dirim vd., 2015). Bu tip ürünler genellikle meyve suyu veya pulpunun, ürünün fiziksel özelliklerini geliştirmek amacıyla farklı taşıyıcı ajanlarla (maltodekstrin, trikalsiyum fosfat, stearik asit tuzları) karıştırılarak veya tek başına kurutulup öğütülmesiyle elde edilmektedir. (Sablanı vd., 2008; Ferrari vd., 2012; Ergüney, 2013; Dirim vd., 2015). Meyve tozu üretiminde en yaygın kullanılan kurutma yöntemleri püskürterek kurutma, sıcak hava ile kurutma, vakumda kurutma ve dondurarak kurutmadır (Kha vd., 2010; Ferrari vd., 2012; Dirim vd., 2015; Agudelo vd., 2017). Öte yandan kurutma işlemi sırasında meyvelerde son ürünün renk, tekstür, aroma ve biyoaktif bileşenler gibi kalite özelliklerini etkileyen birçok fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelebilmektedir. Kurutma işleminde, diğer muhafaza ve işleme yöntemlerinde olduğu gibi ürünün fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesinin maksimum derecede korunması önemlidir (Di Scala ve Crapiste, 2008).

Kamkat ülkemizde turuncgillerin yetiştirilebildiği iklim koşullarını sağlayan Ege, Akdeniz ve Doğu Karadeniz'de yetiştirilebilmektedir. Son yıllarda bu meyvenin fonksiyonel özelliklerinin anlaşılmasıyla birlikte bu meyvenin yetiştiriciliği ve değerlendirilmesiyle ilgili çalışmalar ivme kazanmıştır (Güney vd., 2014; Ünlü, 2014). Ancak bu meyvenin %80'in üzerindeki nem içeriği nedeniyle muhafaza süresinin kısıtlı olduğu bilinmektedir (Schirra vd., 2008). Dolayısıyla bu meyvenin farklı değerlendirilme yöntemlerinin ortaya konması hem üretim sezonu dışında kullanım imkanı bulması, hem de raf stabilitesi açısından önemlidir. Bu çalışma ile kek, pasta, ekmek, dondurma, puding, yoğurt, meyveli içecek gibi gıda ürünlerinde fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanılmak üzere, "Nagami" kamkat

(*Fortunella margarita* Swing) çeşidinin toz ürün olarak üretim olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda farklı kurutma yöntemleriyle elde edilen toz ürünlerde toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam karotenoid ve askorbik asit içerikleri, antioksidan aktivite ve flavonoid bileşen analizleri gerçekleştirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada materyal olarak “Nagami” kamkat (*Fortunella margarita* Swing) çeşidi kullanılmıştır. Kamkat meyveleri Antalya Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü parsellerinden 2017 yılı Ocak ayında hasat edilmiştir. Hasat edilen kamkat meyvelerinin nem içeriği %85.34’tür. Hasat edilen kamkat meyveleri öncelikle saf su ile yıkanmış, bıçakla iki parçaya ayrılarak içerisindeki çekirdekler çıkarılmıştır. Daha sonra meyveler ev tipi blender (TEFAL MB450141) kullanılarak püre haline getirilmiş ve elde edilen püre iki gruba ayrılmıştır. Pürenin bir kısmına püre ağırlığı üzerinden %10 maltodekstrin (10 DE-Dekstroz eşdeğeri) ilave edilerek homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır. Diğer kısmına ise hiçbir şey ilave

edilmemiştir. Hazırlanan püreler kalınlığı 3 mm olacak şekilde cam petrilere konularak sıcak hava kurutma ve dondurarak kurutma olmak üzere 2 farklı kurutma yöntemiyle kurutulmuştur. Sıcak hava ile kurutma işlemi, sıcak hava kurutma fırınında (EKSİS Endüstriyel Kurutma Sistemleri Limited Şirketi, Isparta), 65°C hava sıcaklığında, 1 m/s sabit hava hızında 7 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Dondurarak kurutma işlemi, liyofilizatörde (Christ Beta 2-8 LD plus) iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İşlem ilk aşamada -18°C’de 1.2 mbar basınçta 30 dk, ikinci aşamada -60°C’de 0.011 mbar basınçta 20 saat süre ile sürdürülmüştür. Kurutma işlemi sonunda toz örneklerin nem içeriği yaş baza göre %10-11 arasında belirlenmiştir. Taze meyve ve toz ürünlerde nem içerikleri AOAC (2000) (Metot 986.21) nem tayin yöntemine göre belirlenmiştir. Kurutulmuş püreler bıçaklı öğütücüde (Retsch GRINDOMIX GM 200) 10.000 rpm sabit hızda 1 dk süre ile öğütülmüştür. Bütün kurutma işlemleri 3 tekrarlı yapılmıştır. Çizelge 1’de kamkat tozu üretiminde kullanılan kurutma yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 1. Kamkat tozu üretiminde kullanılan kurutma yöntemleri
Table 1. Drying Methods used for production of kumquat powder

No	Kurutma Yöntemleri <i>Drying Methods</i>	Kurutma Parametreleri <i>Drying Parameters</i>
1	Sıcak Hava Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Hot Air Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	65°C hava sıcaklığı -1 m/s hava hızı <i>65°C air temperature-1 m/s air velocity</i>
2	Sıcak Hava Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Hot Air Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	65°C hava sıcaklığı -1 m/s hava hızı <i>65°C air temperature-1 m/s air velocity</i>
3	Dondurarak Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Freeze Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	1. Aşama: -18°C/ 1.2 mbar basınç/ 30 dk. 2. Aşama:-60°C/ 0.011 mbar basınç/ 20 saat <i>1st stage: -18°C/ 1.2 mbar pressure / 30 minute</i> <i>2nd stage: -60°C/ 0.011 mbar pressure / 20 hours</i>
4	Dondurarak Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Freeze Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	1. Aşama: -18°C/ 1.2 mbar basınç/ 30 dk. 2. Aşama:-60°C/ 0.011 mbar basınç/ 20 saat <i>1st stage: -18°C/ 1.2 mbar pressure / 30 minute</i> <i>2nd stage: -60°C/ 0.011 mbar pressure / 20 hours</i>

Analizler

Ekstraksiyon

Toplam fenolik madde, flavonoid, antioksidan aktivite ve flavonoid bileşen analizlerinde kullanılmak üzere toz örnekler Wang vd. (2007) tarafından önerilen yöntemle göre bazı modifikasyonlar yapılarak ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla 2 g toz örneği üzerine 10 mL %80'lik MeOH (metanol) ilave edilmiş ve orbital çalkalayıcıda 200 rpm hızda 1 saat ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda karışım 4°C'de 4500 rpm hızda 15 dk santrifüj edilerek üst faz ayrı bir tüpe alınmıştır. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanarak üst fazlar biriktirilmiş ve ekstraksiyon çözeltisi ile 30 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar analiz anına kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam Fenolik Madde Miktarı Analizi

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı Spanos ve Wrolstad (1990) tarafından önerilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, örnek ekstraktından 100 µL alınıp üzerine 900 µL saf su, 4 mL Na₂CO₃ (sodyum karbonat) çözeltisi (75 g/L) ve 5 mL 0.2 N Folin Ciocalteu reaktifi ilave edilerek, karışım karanlık ortamda 2 saat bekletilmiştir. Süre sonunda karışımın absorpsansı spektrofotometrede (Shimadzu UV-Vis 160A, Japonya) 765 nm dalga boyunda okunmuş, sonuçlar mg GAE (gallik asit eşdeğeri)/100 g km (kuru madde) olarak hesaplanmıştır.

Toplam Flavonoid Miktarı Analizi

Örneklerin toplam flavonoid miktarı, Zhishen vd. (1999) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntemle modifiye edilerek belirlenmiştir. Örnek ekstraktından 0.5 mL alınıp, üzerine 2 mL distile su ve ardından %5'lik 0.15 mL NaNO₂ (sodyum nitrit) çözeltisi eklenmiştir. 6 dk sonra 0.30 mL %10'luk AlCl₃ (alüminyum klorür) çözeltisi, 6 dk sonra %4'lük, 1 mL NaOH (sodyum hidroksit) çözeltisi eklenerek hacim distile su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Karışımın absorpsansı 510 nm'de ölçülerek, sonuçlar mg CE (kateşin eşdeğeri)/100 g km olarak ifade edilmiştir.

Toplam Karotenoid Miktarı Analizi

Toplam karotenoid miktarı Wang vd., (2008) tarafından önerilen yöntemle göre belirlenmiştir. Bu amaçla 5 g toz örnek üzerine 50 mL heksan-aseton-etanol (v/v;50:25:25) karışımı ilave edilerek 200 rpm'de 10 dk oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. Karışım 4°C'de 6500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş, berrak kısım alınıp, ekstraksiyon çözeltisiyle 50 mL'ye tamamlanmıştır. Ekstraktların absorpsansları 450 nm dalga boyunda ölçülerek sonuçlar aşağıda verilen formül (Denklem 1) aracılığıyla β-karoten cinsinden mg/100 g km olarak hesaplanmıştır [E^{1/2} (Ekstinksiyon katsayısı): 2505; Sf: Seyreltme faktörü].

$$\text{Toplam karotenoid miktarı} = (\text{Absorbans} \times \text{Sf} \times 10 / E^{1/2}) \times 100 \quad (1)$$

Askorbik Asit Analizi

Örneklerin askorbik asit miktarı HPLC ile belirlenmiştir (Sdiri vd., 2012). Bu amaçla toz örneklerden 2 g alınarak üzerine 10 mL %3'lük HPO₃ (meta-fosforik asit) çözeltisi eklenerek 1 dk süre ile homojenize edilmiştir. Karışım 4°C'de 6500 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz alınarak HPO₃ çözeltisi ile seyreltilmiş ve 0.45 µm gözenek çaplı membran filtreden geçirilerek HPLC (Shimadzu 2030 C 3 d Prominence-i, Japonya) cihazına verilmiştir. Analizde dedektör olarak PDA (Photo-diode Array) dedektör, mobil faz olarak pH'sı H₃PO₄ (p-fosforik asit) çözeltisi ile 2.3'e ayarlanmış %2'lik KH₂PO₄ (potasyum dihidrojen fosfat) kullanılmıştır. Ayrım İnertsil ODS-3 C-18 kolon (5µm, 250x4.6 i.d.) (GL Sciences, Japonya) ile 243 nm dalga boyunda, izokratik olarak 0.5 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Analizde kullanılan enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı ise 25°C olarak belirlenmiştir. Askorbik asit miktarı standart kullanılarak oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi kullanılarak mg/100 g km olarak hesaplanmıştır.

Antioksidan Aktivite Analizi

Örneklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikalinin inhibisyonu (Cemeroğlu, 2010) ve ORAC (Oksijen Radikalleri

Absorbans Kapasitesi) (Ena vd., 2012) olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır.

DPPH radikalini inhibisyonuna dayalı yöntemde metanol kullanılarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış örnek ekstraktlarının 0.1 mL'si üzerine yine metanolde hazırlanmış (25 mg/L) DPPH çözeltisinden 3.9 mL ilave edilmiş ve vortekste 30 saniye karıştırılarak oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Örneklerin absorbansı UV-Vis spektrofotometre'de (Shimadzu UV-Vis 160A, Japonya) 515 nm'de metanole karşı ölçülmüş ve her bir örnek hacmine karşılık gelen yüzde inhibisyon değerleri aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. DPPH radikalini %50'sini inhibe eden ekstrakt konsantrasyonu olarak tanımlanan IC₅₀ değeri ise farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlara karşı çizilen DPPH radikalini % inhibisyon oranından elde edilen doğru denkleminde (Denklemler 2), mg/mg DPPH km olarak hesaplanmıştır.

$$\text{İnhibisyon (\%)} = \left[\frac{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekstrakt}})}{A_{\text{DPPH}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Örneklerin ORAC değerlerini belirlemek amacıyla 2750 µL fluorescein çözeltisine (0.6136 µM) 37 µL fosfat tamponu (75 mM, pH 7.4) ve 75 µL örnek ekstraktı ilave edilerek 37°C'de 30 dk bekletilmiştir. Karışıma 0.32 µM fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış 75 µL 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride ilave edilerek reaksiyon durdurulmuştur. Çözeltinin flüoresans şiddeti flüoresans spektrofotometresi (Cary Eclipse, Agilent Technologies, Kaliforniya, ABD) kullanılarak 490 nm eksitasyon ve 512 nm emisyon dalga boylarında ölçülmüştür. ORAC değeri, aynı koşullarda örnek yerine kör (fosfat tamponu) ve Troloks standardı (100 µM) ile hazırlanan çözeltilerin flüoresans şiddeti belirlenerek Denklem 3'e göre mM TE (Troloks Eşdeğeri)/100 g km cinsinden hesaplanmıştır. S_{örnek}, S_{kör} ve S_{troloks} sırasıyla örnek, kör ve troloks'un flüoresans şiddetini, S_f seyreltme faktörünü ifade etmektedir.

$$\text{ORAC (mM TE/100 g)} = S_f \times \frac{(S_{\text{örnek}} - S_{\text{kör}})}{(S_{\text{troloks}} - S_{\text{kör}})} \quad (3)$$

Flavonoid Bileşen Analizi

Örneklerin flavonoid bileşenleri Kuhnle vd. (2009) tarafından önerilen yöntemle bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Analizlerde Mass Hunter paket programı ile çalışan Agilent 6430 Triple Quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) marka elektrosprey iyon kaynaklı kütle spektrometresi ve Agilent-1290 Infinity (Agilent Technologies, Waldbronn, Almanya) marka sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Çalışma pozitif ve negatif iyon modunda yürütülmüştür. Çalışmada azot gazı sıcaklığı 350°C, gaz akış hızı 10 mL/dk, iyonizasyon enerjisi 70 Ev'tur. Çalışmada 50-500 amu arasında kütle spektralleri kaydedilmiştir. Analiz Zorbax SB-C18 (150x2.1 mm, 1.8 µm) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ABD) kolonda, 0.3 ml/dakika akış hızında yürütülmüştür. Kolon sıcaklığı 35°C'dir. Ponsirin, narirutin, rhoifolin, didymin, luteolin, naringin, rutin ve kuersetin standartlarından farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmış ve kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Örnek ekstraktları 0.45 µm çaplı membran filtreden geçirilerek cihaza enjekte edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 3 µL'dir. Çalışmada kullanılan mobil fazlar, Solvent A=(5/95:v/v) metanol:su (%0.01 formik asit ve 5 mM amonyum format içeren) ve solvent B=% 100 metanol'dür. Kullanılan elüsyon profili şu şekildedir: 0-0.5 dk %5 solvent B (sabit akış), 0.5-3 dk %30 solvent B, 3-8 dk %95 solvent B, 8-11 dk % 95 solvent B (sabit akış), 11-11.10 dk %5 solvent B, 11.10-12 dk %5 solvent B, 12-15 dk %5 solvent B. Sonuçlar mg/100 g km olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel Analizler

Çalışma 3 tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Elde edilen sonuçlar varyans analizi ile değerlendirilmiş, önemli bulunan sonuçlar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile P <0.05 düzeyinde karşılaştırılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede SAS istatistik paket programı (Version 6.12, SAS Institute, Cary, NC, ABD) kullanılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Toplam fenolik madde ve Flavonoid Miktarı

Çizelge 2’de farklı yöntemlerle elde edilen kamkat tozlarına ait toplam fenolik madde ve flavonoid içerikleri verilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı 262.75-697.90 mg GAE/ 100 g arasında tespit edilmiş olup, en yüksek toplam fenolik madde miktarı 4 No’lu örnekte, en düşük toplam fenolik madde miktarı 1 No’lu örnekte belirlenmiştir ($P < 0.05$). En yüksek toplam flavonoid madde içeriği 4 No’lu örnekte (219.68 mg CE/100 g), en düşük toplam flavonoid madde içeriği ise 2 No’lu örnekte (41.08 mg CE/100 g) tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Bulgularımız Gabriele vd. (2017)’nin liyofilize edilmiş bergamot tozunda belirledikleri toplam fenolik (17.44 mg GAE/g km) ve flavonoid (16.74 mg CE/g km) değerlerinden düşüktür. Meyvenin çeşidi, ekstraksiyon ve analiz koşulları fenolik ve flavonoid miktarını etkileyebilmektedir. Genel olarak sıcak hava kurutma yönteminde toplam flavonoid miktarları hariç, maltodekstrinsiz kurutulmuş örneklerin toplam fenolik madde ve flavonoid miktarı, maltodekstrin ilaveli örneklerden yüksek bulunmuştur. Ağırlıkça %10 maltodekstrin ilave edilmiş örneklerde püre miktarı, maltodekstrinsiz örneklerden daha düşüktür. Dolayısıyla analiz için alınan toz örneğinde maltodekstrin olması yani formülasyon, fenolik içeriğini etkilemiş olabilir. Dondurarak kurutulmuş örneklerin toplam fenolik madde ve flavonoid miktarları, sıcak hava kurutma ile kurutulmuş örneklerden yüksek bulunmuştur. Sıcak hava kurutmada kullanılan yüksek sıcaklık dereceleri fenolik bileşiklerin özellikle flavonoidlerin parçalanmasına yol açarak toplam fenolik madde ve flavonoid kaybına neden olabilmektedir (Mcsweeney ve Seetharaman, 2015). Sıcak hava ile kurutulmuş toz örneklerinde maltodekstrin ilavesinin flavonoidlerin termal ve oksidatif parçalanma reaksiyonlarına bağlı kaybını azaltmış olduğu düşünülmektedir. Garcia-Salas vd. (2013) dondurarak kurutma ve vakum kurutma yöntemiyle elde ettikleri bütün limon tozlarında dondurarak kurutulmuş örneklerin, vakumda kurutulmuş örneklerden daha yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğunu, ancak aralarında istatistiksel bir fark olmadığını belirlemişlerdir. Farklı turuncgil çeşitlerinin

dondurarak kurutma, sıcak hava ile kurutma ve güneşte kurutulması sonrası en yüksek fenolik ve flavonoid içeriğine sahip örneklerin dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen örnekler olduğu belirlenmiştir (Sun vd., 2015). Dondurarak kurutma yönteminde uygulanan düşük sıcaklık ve vakum basıncı, fenoliklerin parçalanmasına yol açan termal ve oksidatif reaksiyonları büyük oranda sınırlandırmaktadır (Mcsweeney ve Seetharaman, 2015).

Toplam Karotenoid ve Askorbik Asit Miktarı

Turuncgiller karotenoidlerin önemli bir kaynağıdır. Karotenoidlerin insan sağlığı açısından başlıca fonksiyonu A vitaminin ön maddesi olmasıdır. Turuncgillerde A vitaminin ön maddesi olan 16 adet karotenoid olduğu bilinmektedir (Silalahi, 2002). Kamkat meyvesinin farklı çeşitlerinde tespit edilen başlıca karotenoidlerin β -kriptoksantin, β -karoten, lutein, zeaksantin olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2007; Schirra vd., 2008; Wang vd., 2008). Farklı yöntemlerle elde edilen kamkat tozlarının toplam karotenoid miktarları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). En yüksek toplam karotenoid miktarı 4 no’lu örnekte (59.60 mg/100 g), en düşük toplam karotenoid miktarı ise 3 No’lu örnekte (30.69 mg/100 g) tespit edilmiştir (Çizelge 3). Hem sıcak hava kurutma hem de dondurarak kurutma yönteminde maltodekstrinsiz örneklerin (2 ve 4 No’lu) daha yüksek karotenoid içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. Oliveira vd. (2015) yaptıkları çalışmada püre haline getirilen palm meyveleri %8 maltodekstrin ilaveli ve maltodekstrinsiz olarak, 65°C’de sıcak hava fırınında ve liyofilizatörde kurutulmuş toz haline getirilmiştir. Benzer şekilde her iki yöntemde de maltodekstrin ilavesiz örneklerin daha yüksek β -karoten içeriğine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmacılar, maltodekstrin ilavesinin β -karoten ekstraksiyon verimini engelleyebileceğini ifade etmişlerdir. Tuyen vd., (2010) gac (*Momordica cochinchinensis*) meyvelerini farklı maltodekstrin konsantrasyonlarında ve farklı hava sıcaklıklarında püskürterek kurutma yöntemiyle kurutulmuşlar ve maltodekstrin konsantrasyonundaki artışın, toz üründe toplam karotenoid miktarında azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Çizelge 2. Farklı kurutma yöntemleri ile elde edilen kamkat tozlarının toplam fenolik madde ve flavonoid miktarları*

Table 2. Total phenolic and flavonoid contents of kumquat powders obtained by different drying methods*

Kurutma Yöntemleri <i>Drying Methods</i>	Toplam fenolik madde Miktarı (mg GAE/100 g km) <i>Total Phenolic Contents</i> (mg GAE/ 100 g dm)	Toplam Flavonoid Miktarı (mg CE/100 g km) <i>Total Flavonoid Contents</i> (mg CE/100 g dm)
1 Sıcak Hava Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Hot Air Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	262.75±5.10 d	52.29±2.05 c
2 Sıcak Hava Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Hot Air Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	320.09±13.07 c	41.08±1.94 d
3 Dondurarak Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Freeze Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	445.56 ±19.81 b	153.51±1.15 b
4 Dondurarak Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Freeze Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	697.90±5.25 a	219.68± 2.92 a

* Aynı sütundaki farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$).* The differences between means expressed different letters within the same column are significant ($P < 0.05$).

Çizelge 3. Farklı kurutma yöntemleri ile elde edilen kamkat tozlarının toplam karotenoid ve askorbik asit miktarları*

Table 3. Total carotenoid and ascorbic acid contents of kumquat powders obtained by different drying methods*

Kurutma Yöntemleri <i>Drying Methods</i>	Toplam Karotenoid Miktarı (mg / 100 g km) <i>Total Carotenoid Contents</i> (mg / 100 g dm)	Askorbik Asit Miktarı (mg / 100 g km) <i>Ascorbic Acid Contents</i> (mg / 100 g dm)
1 Sıcak Hava Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Hot Air Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	34.79±0.24 c	41.89±1.43 d
2 Sıcak Hava Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Hot Air Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	48.21±0.05 b	46.53±1.02 c
3 Dondurarak Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Freeze Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	30.69±0.30 d	163.34 ±0.16 a
4 Dondurarak Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Freeze Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	59.60±0.14 a	124.45±1.34 b

* Aynı sütundaki farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$).* The differences between means expressed different letters within the same column are significant ($P < 0.05$).

Kamkat tozu örneklerinin askorbik asit değerleri 45.45-163.36 mg/100 g arasında belirlenmiştir. (Çizelge 3). Gabriele vd. (2017) liyofilize edilmiş bütün bergamot tozu örneğinde askorbik asit miktarını 66.93 mg AAE/100 g km olarak belirlemiştir. Dondurarak kurutulmuş kamkat tozu örneklerinin askorbik asit miktarları (124.45-163.34 mg/100 g km) bu değerden yüksektir. Askorbik asit değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli olup ($P < 0.05$), en yüksek askorbik asit içeriği 3 No'lu örnekte, en düşük askorbik asit içeriği ise 1 No'lu örnekte tespit edilmiştir. Askorbik asit turunçgillerde yaygın olarak bulunan suda çözünebilir bir vitamindir. Oksijen, ışık, sıcaklık, nem, pH, enzimler ve metalik iyon katalizörlerinin varlığında kolayca parçalanabilmektedir (Santos ve Silva, 2008). Bu nedenle özellikle sıcak hava ile kurutma işlemlerinde uygulanan sıcaklık ve diğer kurutma şartlarına bağlı olarak önemli kayıplar meydana gelebilmektedir (Kadam vd., 2011). Yapılan çalışmalar dondurarak kurutma yönteminin sıcak hava kurutma yöntemine göre daha az askorbik asit kaybına neden olduğunu göstermiştir (Chang vd., 2006; Serna-Cock vd., 2015; Raja vd., 2017). Maltodekstrin ilavesinin dondurarak kurutma yönteminde askorbik asit miktarını olumlu etkilediği gözlenmiştir. Toz ürünlerin üretiminde taşıyıcı ajan olarak kullanılan maltodekstrinin meyvedelerdeki askorbik asit gibi biyoaktif bileşenlerin oksidasyonunu engellediği bildirilmiştir (Ahmed vd., 2010; Rocha-Parra vd., 2016).

Antioksidan aktivite

Toz örneklerin DPPH radikalinin inhibisyonuna dayalı antioksidan aktivitesi IC_{50} değeri olarak Çizelge 4'de verilmiştir. IC_{50} değeri başlangıç DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli madde konsantrasyonu olarak tanımlanmakta ve IC_{50} değerinin düşük olması DPPH radikalinin yüksek süpürücü aktivitesine işaret etmektedir (Orak vd., 2011). İstatistiksel açıdan toz örneklerin IC_{50} değerleri arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). En yüksek antioksidan aktivite 4 No'lu örnekte, en düşük antioksidan aktivite 3 No'lu örnekte tespit edilmiştir. Farklı taşıyıcı ajan formülasyonları ile dondurarak ve püskürtterek kurutma tekniği ile

üretilmiş greyfurt tozlarında, dondurarak kurutulmuş örneklerin diğer örneklere göre daha yüksek DPPH süpürme aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Agudelo vd., 2017). Sun vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada, dondurarak kurutulmuş farklı turunçgil çeşitlerinin DPPH radikalini süpürme aktivitesinin sıcak hava ve güneşte kurutulmuş örneklere göre daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Toz örneklerin ORAC değerlerinin 15.13-56.24 mM TE/100 g arasında değiştiği (Çizelge 4) ve bu değerlerin kurutma koşullarından etkilendiği gözlenmiştir ($P < 0.05$). Bulgularımız liyofilize edilmiş bütün bergamot tozu (950 μ mol TE/g) ve limon tozu (913 μ mol TE/g) ORAC değerlerinden düşüktür (Garcia-Salas vd., 2013; Gabriele vd., 2017). En yüksek ORAC değeri 4 No'lu örnekte, en düşük ORAC değeri ise 1 No'lu örnekte belirlenmiş olup, dondurarak kurutulmuş örneklerin daha yüksek ORAC değerlerine sahip olduğu kaydedilmiştir. Genel olarak her iki kurutma yönteminde maltodekstrin ilaveli örneklerin daha düşük antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Michalska vd. (2018) farklı yöntemlerle (dondurarak, vakumda ve püskürtmeli kurutma) elde edilen turna yemişi tozlarında %15 maltodekstrin ilaveli örneklerin antioksidan aktivitelerinin, maltodekstrin ilave edilmeden elde edilen örneklerden düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca vakum kurutmada uygulanan kurutma sıcaklıklarındaki artışın da fenoliklerin parçalanmasını sağlayarak antioksidan aktiviteyi azalttığını belirtmişlerdir. Suravanichnirachorn vd. (2018) maltodekstrin ve arabik gam gibi farklı taşıyıcı ajan kullanarak dondurarak kurutma yöntemi ile elde ettikleri mao meyvesi tozlarında taşıyıcı ajan konsantrasyonu artışının antioksidan aktiviteyi düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Flavonoid bileşenleri

Kamkat tozu örneklerinin flavonoid bileşenleri LC/MS-MS ile belirlenmiştir. Çizelge 5'te toz ekstraktlarında tespit edilen flavonoid bileşenlerinin miktarları verilmiştir. Kamkat tozu örneklerinde dört adet flavanon (pönsirin, didymin, narirutin, naringin), iki adet flavon (rhoifolin, luteolin) ve iki adet flavonol (rutin, kuersetin) olmak üzere toplam sekiz flavonoid bileşeni tespit edilmiştir. Tüm örneklerde en fazla

miktarda bulunan bileşenin ponsirin olduğu, daha sonra ise sırasıyla narirutin, didymin ve rhoifolin olduğu bulunmuştur. En düşük miktarlarda belirlenen bileşen ise naringindir. Yapılan çalışmalarda kamkat meyvesinde DGPP, fortunellin, asasetin 8-C-neohesperidosid (margariten), asasetin 6-C-neohesperidosid

(isomargariten), apigenin 8-C-neohesperidosid, ponsirin, rhoifolin, narirutin, didymin, luteolin, naringin, hesperidin, neohesperidin, eriositrin, neoponsirin, rutin ve kuersetin gibi flavonoidlerin olduğu belirlenmiştir (Kawail vd., 1999; Nogata vd., 2006; Wang vd., 2007; Schirra vd., 2008; Ramful vd., 2011; Lou vd., 2016).

Çizelge 4. Farklı kurutma yöntemleri ile elde edilen kamkat tozlarının IC₅₀ ve ORAC değerleri*

Table 4. IC₅₀ and ORAC values of kamquat powders obtained by different drying methods*

Kurutma Yöntemleri <i>Drying Methods</i>	IC ₅₀ (mg/mg DPPH km) <i>IC₅₀ (mg/mg DPPH dm)</i>	ORAC (mM TE /100 g km) <i>ORAC (mM TE /100 g dm)</i>
1 Sıcak Hava Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Hot Air Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	126.53±0.14 b	15.13±0.42 d
2 Sıcak Hava Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Hot Air Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	93.51±0.83 c	22.15±0.35 c
3 Dondurarak Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) <i>Freeze Drying</i> (<i>With 10% of maltodextrin</i>)	137.16±2.34 a	27.34±1.22 b
4 Dondurarak Kurutma (Maltodekstrinsiz) <i>Freeze Drying</i> (<i>Without maltodextrin</i>)	76.16±2.66 d	56.24±1.49 a

* Aynı sütündeki farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$).

* The differences between means expressed different letters within the same column are significant ($P < 0.05$).

Kamkat tozu örneklerinde flavonoid bileşenleri arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Maltodekstrinsiz dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen toz örneğinde (4 No'lu örnek) tüm flavonoid bileşenleri en yüksek miktarda bulunmuştur. Flavonoid bileşenlerinin en düşük miktarda belirlendiği toz örneği ise maltodekstrinsiz sıcak hava kurutma yöntemi ile elde edilen toz örneği (2 No'lu örnek) olmuştur. Toplam flavonoid içeriği de benzer şekilde en yüksek 4 No'lu örnekte, en düşük 2 No'lu örnekte tespit edilmiştir. Sıcak hava ile kurutma yönteminde maltodekstrin ilaveli örneklerin flavonoid bileşen miktarları, maltodekstrinsiz örneklerden yüksek bulunmuştur. Maltodekstrin ilavesinin flavonoidlerin oksidasyonunu kısmen engellediği (Rocha Para vd., 2016; Zoric vd., 2017) düşünülmektedir. Dondurarak kurutulan

örneklerin flavonoid bileşen miktarları, sıcak hava kurutma yöntemi ile kurutulan örneklerden yüksek bulunmuştur. Farklı taşıyıcı ajan formülasyonları ile dondurarak ve püskürterek kurutma tekniği ile üretilmiş greyluft tozlarında, dondurarak kurutulmuş örneklerin püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen örneklere göre fenolik bileşikleri %90-95 oranında koruduğu tespit edilmiştir (Agudelo vd., 2017). Farklı turuncgil çeşitlerinin dondurarak kurutma, sıcak hava ile kurutma ve güneşte kurutulması sonrası naringin, hesperidin, narirutin, neohesperidin gibi flavonoidler en yüksek miktarlarda dondurarak kurutma yöntemi ile kurutulan örneklerde belirlenmiştir (Sun vd., 2015).

Dondurarak kurutma yönteminde uygulanan düşük sıcaklık ve vakum basıncı, fenoliklerin

parçalanmasına yol açan termal ve oksidatif reaksiyonları büyük oranda sınırlandırmaktadır (McSweeney and Seetharaman, 2015). *Citrus japonica* var. margarita çeşidine ait olgunlaşmamış kamkatların kurutulmasının flavonoid kompozisyonuna etkisini araştırıldığı çalışmada liyofilize edilmiş örneklerde ponsirin ve rhoifolin miktarı sırasıyla 35 mg/100 g ve 14 mg/100 g

olarak belirlenmiştir. Çalışmada kurutma sıcaklıkları ve süresinin flavonoidlerin miktarını etkilediği belirlenmiştir (Lou vd., 2015). Çalışmamızda tespit ettiğimiz ponsirin ve rhoifolin miktarı literatürden daha yüksektir. Bu farklılığın meyvenin çeşidi, kurutma ve ekstraksiyon koşulları gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 5. Farklı kurutma yöntemleri ile elde edilen kamkat tozlarının flavonoid bileşenleri*
Table 5. Flavonoid compounds of kamquat powders obtained by different drying methods*

Kurutma Yöntemleri	Ponsirin (mg/100 g km)	Narirutin (mg/100 g km)	Didymin (mg/100 g km)	Rhoifolin (mg/100 g km)	Rutin (mg/100 g km)	Luteolin(m g/100 g km)	Kuersetin (mg/100 g km)	Naringin (mg/100 g km)
Methods	Poncirin (mg/100 g dm)	Narirutin (mg/100 g dm)	Didymin (mg/100 g dm)	Rhoifolin (mg/100 g dm)	Rutin (mg/100 g dm)	Luteolin (mg/100 g dm)	Quercetin (mg/100 g dm)	Naringin (mg/100 g dm)
1 Sıcak Hava Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) Hot Air Drying (With 10% of maltodextrin)	97.13±1.65 c	63.53±2.62 c	65.83±2.22 c	32.15±6.56 cb	7.87±0.44 c	7.32±0.23 c	1.02±0.08 c	0.64±0.01 c
2 Sıcak Hava Kurutma (Maltodekstrinsiz) Hot Air Drying (Without maltodextrin)	63.16±1.41 d	46.14±0.90 d	41.02±0.10 d	20.48±2.37 c	7.30±0.28 c	5.26±0.49 d	0.99±0.02 c	0.52±0.004 d
3 Dondurarak Kurutma (%10 maltodekstrin ilaveli) Freeze Drying (With 10% of maltodextrin)	132.55±4.80 b	98.54±1.03 b	87.75±4.29 b	39.60±4.91 b	22.19±2.18 b	11.00±1.38 b	1.26±0.21 b	1.20±0.02 b
4 Dondurarak Kurutma (Maltodekstrinsiz) Freeze Drying (Without maltodextrin)	219.03±3.30 a	155.86±2.15 a	157.54±4.45 a	93.84±10.30 a	28.88±1.08 a	15.27±0.48 a	2.48±0.06 a	1.36±0.002 a

* Aynı sütundaki farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($P < 0.05$).

* The differences between means expressed different letters within the same column are significant ($P < 0.05$).

SONUÇ

Bu çalışmada kamkat meyvesinden fonksiyonel meyve tozu üretim olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda kamkat meyvesi püre haline getirilip maltodekstrinsiz ve %10

maltodekstrin ilaveli olarak sıcak havada ve dondurarak kurutma yöntemi olmak üzere iki farklı yöntemle kurutulmuş ve öğütülerek toz haline getirilmiştir. Toplam fenolik madde, flavonoid ve karotenoid miktarı, antioksidan

aktivite ve flavonoid bileşenler gibi fonksiyonel özellikler açısından maltodekstrinsiz dondurarak kurutma yöntemi ile elde edilen toz örneğinin diğer yöntemlerle elde edilen örneklerle göre daha yüksek değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Maltodekstrin ilavesinin dondurarak kurutma yöntemiyle elde edilen toz üründe askorbik asit içeriğini, sıcak hava kurutma yönteminde ise flavonoid bileşenlerin miktarını olumlu etkilediği gözlenmiştir. Elde edilen kamkat tozları kek, pasta, puding, ekmek, meyveli içecek gibi ürünlerde aroma verici, renklendirici ve fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanılabilme olanağı bulacaktır. Bu tip ürünlerin depolama stabilitesi ve fizikokimyasal özellikleri ile ilgili ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Hayvan Sağlığı ve Gıda Yem Araştırmaları Daire Başkanlığı tarafından desteklenen projenin (TAGEM/HSGYAD/17/A03/P06/138) bir bölümüdür.

KAYNAKLAR

Agocs, A., Nagy, V., Szabo, Z., Márk, L., Ohmacht, R., Deli, J. (2007). Comparative study on the carotenoid composition of the peel and the pulp of different citrus species. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 8: 390–394.

Agudelo, C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Martinez-Navarrete, N., Ferreira, I.C. (2017). Phytochemical content and antioxidant activity of grapefruit (Star Ruby): A comparison between fresh freeze-dried fruits and different powder formulations. *LWT-Food Sci Technol*, 80: 106–112.

Ahmed, M., Akter, M.S., Lee, J.C., Eun, J.B. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components. physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT-Food Sci Technol*, 43: 1307–1312.

AOAC (2000). Official Method of Analysis AOAC INTERNATIONAL. 17th Edition, 986.21 Moisture in Spices, Gaithersburg, MD, USA.

Cemeroğlu, B. (2010). *Gıda Analizleri*. Genişletilmiş 2. Baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 34. Bizim Grup Basımevi. Ankara, Türkiye, 657s.

Chang, C.H., Lin, H.Y., Chang, C.Y., Liu, Y.C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *J Food Eng*, 77(3): 478–485.

Chiu, N.C., Chang, K.S. (1998). The illustrated medicinal plants of Taiwan. Taiwan: SMC publishing Ltd. Taipei, Taiwan. Vol 5. 194p.

Choi, H.S. (2005). Characteristic odor components of kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) peel oil. *J. Agric. Food Chem*, 53: 1642–1647.

Di Scala, K.C., Crapiste, G.H. (2008). Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. *LWT-Food Sci Technol*, 41: 789–795.

Dirim, S.N., Çalışkan, G., Ergün, K. (2015). Dondurularak Kurutulmuş Bazı Meyve Tozlarının Toz Ürün Özelliklerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 40: 85–92.

Ena, A., Pintucci, C., Carozzi, P. (2012). The recovery of polyphenols from olive mill waste using two adsorbing vegetable matrices. *J Biotech*, 157: 573–577.

Ergüney, E. (2013). Karayemiş Tozunun Fiziksel Özelliklerinin İyileştirilmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Ferrari, C.C., Germer, S.P.M., De Aguirre, J.M. (2012). Effects of spray-drying conditions on the physicochemical properties of blackberry powder. *Dry Technol*, 30: 154–163.

Gabriele, M., Frassinetti, S., Caltavuturo, L., Montero, L., Dinelli, G., Longo, V., Di Gioia, D., Pucci, L. (2017). Citrus bergamia powder: antioxidant antimicrobial and anti-inflammatory properties. *J Funct Foods*, 31, 255–265.

Garcia-Salas, P., Gomez-Caravaca, A.M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Guerra-Hernandez, E., Garcia-Villanova, B., Fernandez-Gutierrez, A. (2013). Influence of technological

- processes on phenolic compounds. organic acids. furanic derivatives. and antioxidant activity of whole-lemon powder. *Food Chem*, 141: 869–878.
- Gölükcü, M., Toker, R., Coşkun, R. (2011). Effect of cultivation techniques on essential oil composition of kumquat (*Fortunella margarita*). 4th International Congress on Food and Nutrition. 12-14 Ekim 2011, İstanbul, Türkiye, 145p.
- Güney, M., Öz, A.T., Kafkas, E. (2015). Comparison of lipids, fatty acids and volatile compounds of various kumquat species using HS/GC/MS/FID techniques. *J Sci Food Agric*, 95: 1268–1273.
- Jayaprakasha, G.K., Murthy, K.C., Etlinger, M., Mantur, S.M., Patil, B.S. (2012). Radical scavenging capacities and inhibition of human prostate (LNCaP) cell proliferation by *Fortunella margarita*. *Food Chem*, 131: 184–191.
- Kadam, D.M., Rai, D.R., Patil, R.T., Wilson, R.A., Kaur, S., Kumar, R. (2011). Quality of fresh and stored foam mat dried Mandarin powder. *Int J Food Sci Technol*, 46: 793–799.
- Kawail, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, K., Yano, M. (1999). Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem*, 47: 3565–3571.
- Kuhnle, G.G.C., Dell'Aquila, C., Runswick, S.A., Bingham, S.A. (2009). Variability of phytoestrogen content in foods from different sources. *Food Chem*, 113: 1184–1187.
- Lien, D.N., Quynh, N.T., Quang, N.H., Ngan, N.T.T. (2009). Anti-Obesity and Body Weight Reducing Effect of *Fortunella japonica* Peel Extract Fractions in Experimentally Obese Mice. *VNU Journal of Science. Natural Sciences and Technology*, 25: 179–187.
- Lou, S.N., Lai, Y.C., Huang, J.D., Ho, C.T., Ferng, L.H.A., Chang, Y.C. (2015). Drying effect on flavonoid composition and antioxidant activity of immature kumquat. *Food Chem*, 171: 356–363.
- Lou, S.N., Lai, Y.C., Hsu, Y.S., Ho, C.T. (2016). Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. *Food Chem*, 197: 1–6.
- Mcsweeney, M., Seetharaman, K. (2015). State of polyphenols in the drying process of fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55: 660–669.
- Michalska, A., Wojdylo, A., Honke, J., Ciska, E., Lauer, W. (2018). Drying-induced physico-chemical changes in cranberry products. *Food Chem*, 240: 448–455.
- Morton, J. (1987). Kumquat. In: *Fruits of Warm Climates*. Creative Resource Systems, Miami, FL, USA. pp. 182–185.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70: 178–192.
- Oliveira, D.M., Lima, C.G., Clemente, E., Afonso, M.R.A., Costa, J.M.C.D. (2015). Stability of bioactive compounds and quality parameters of grugru palm powder (*Acrocomia Aculeata*) in different drying conditions. *J Food Qual*, 38: 94–102.
- Orak, H.H., Aktas, T., Yagar, H., İşbilir, S.S., Ekinci, N., Sahin, F.H. (2011). Antioxidant activity, some nutritional and colour properties of vacuum dried strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 10(3): 327–338.
- Peng, L., Sheu, M., Lin, L., Wud, C., Chiang, H., Lin, W., Lee, M., Chen, H. (2013). Effect of heat treatments on the essential oils of kumquat (*Fortunella margarita* Swingle). *Food Chem*, 136: 532–537.
- Raja, K.S., Taip, F.S., Azmi, M.M.Z., Shishir, M.R.I. (2017). Effect of pre-treatment and different drying methods on the physicochemical properties of *Carica papaya* L. Leaf powder. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, (In press).
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O.I., Bourdon, E., Bahorun, T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Res Int*, 44: 2088–2099.
- Rocha-Parra, D.F., Lanari, M.C., Zamora, M.C., Chirife, J. (2016). Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine. *LWT-Food Sci Technol*, 70: 162–170.

- Sablani, S.S., Shrestha, A.K., Bhandari, B.R. (2008). A new method of producing date powder granules: Physicochemical characteristics of powder. *J Food Eng*, 87: 416–421.
- Santos, P.H.S., Silva, M.A. (2008). Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables - A review. *Dry Technol*, 26: 1421–1437.
- Schirra, M., Palma, A., Aquino, S.D., Angioni, A., Minello, E.V., Melis, M., Cabras, P. (2008). Influence of postharvest hot water treatment on nutritional and functional properties of kumquat (*Fortunella japonica* Lour. Swingle Cv. Ovale) Fruit. *J Agric Food Chem*, 56: 455–460.
- Sdiri, S., Bermejo, A., Aleza, P., Navarro, P., Salvador, A. (2012). Phenolic composition. organic acids. sugars. vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. *Food Res Int*, 49: 462–468.
- Serna-Cock, L., Vargas-Muñoz, D.P., Aponte, A.A. (2015). Structural. physical. functional and nutraceutical changes of freeze-dried fruit. *Afr J Biotechnol*, 14: 442–450.
- Silalahi, J. (2002). Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr*, 11: 79–84.
- Spanos, G., Wrolstad, R.E. (1990). Phenolics of apple. pear and white grape juices and their changes with processing and storage. *J Agric Food Chem*, 40: 1478–1487.
- Sun, Y., Shen, Y., Liu, D., Ye, X. (2015). Effects of drying methods on phytochemical compounds and antioxidant activity of physiologically dropped un-matured citrus fruits. *LWT-Food Sci Technol*, 60: 1269–1275.
- Suravanichnirachorn, W., Haruthaithanasan, V., Suwonsichon, S., Sukatta, U., Maneeboon, T., Chantrapornchai, W. (2018). Effect of carrier type and concentration on the properties. anthocyanins and antioxidant activity of freeze-dried mao [*Antidesma bunius* (L.) Spreng] powders. *Agriculture and Natural Resources*, 1–7.
- Tuyen, C.K., Nguyen, M.H., Roach, P.D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *J Food Eng*, 98: 385–392.
- Ünlü, A. (2014). Turunçgillerin küçük mücevheri kamkat. *Borsanomi Dergisi*, 49: 57–60.
- Wang, Y.C., Chuang, Y.C., Hsu, H.W. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chem*, 106: 277–284.
- Wang, Y.C., Chuang, Y.C., Ku, Y.H. (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chem*, 102: 1163–1171.
- Wang, Y.W., Zeng, W.C., Xu, P.Y., Lan, Y.J., Zhu, R.X., Zhong, K., Huang, Y.N., Gao, H. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Kumquat (*Fortunella crassifolia* Swingle) Peel. *Int J Mol Sci*, 13: 3382–3393.
- Zhishen, J., Tang, M., Wu, J. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64: 555–559.
- Zorić, Z., Pelaić, Z., Pedisić, S., Garofulić, I. E., Kovačević, D. B., Dragović-Uzelac, V. (2017). Effect of storage conditions on phenolic content and antioxidant capacity of spray dried sour cherry powder. *LWT-Food Sci Technol*, 79: 251–259.

PSF/SiO₂ NANOKOMPOZİT MEMBRAN ÜRETİMİ VE ELMA SUYU BERRAKLAŞTIRMA PROSESİNDE KULLANIMI

Solmaz Sebnem Severcan^a, Niğmet Uzal^b, Kevser Kahraman^{c*}

^aAbdullah Gül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Makine Mühendisliği, Kayseri, Türkiye

^bAbdullah Gül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği, Kayseri, Türkiye

^cAbdullah Gül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Mühendisliği, Kayseri, Türkiye

Geliş / Received: 25.05.2019; Kabul / Accepted: 06.07.2019; Online baskı / Published online: 12.07.2019

Severcan, S.S., Uzal, N., Kahraman, K (2019). PSF/SiO₂ nanokompozit membran üretimi ve elma suyu berraklaştırma prosesinde kullanımı. *GIDA* (2019) 44 (4): 618-628 doi: 10.15237/gida.GD19083

Severcan, S.S., Uzal, N., Kahraman, K (2019). Fabrication of PSF/SiO₂ nanocomposite membrane and application in apple juice clarification process. *GIDA* (2019) 44 (4): 618-628 doi: 10.15237/gida.GD19083

ÖZ

Bu çalışmada faz dönüşümü yöntemi kullanılarak üretilen PSF/PEI (%20/2, w/w) membranlar, farklı konsantrasyonlarda SiO₂ nanopartikülü (%0,01; 0,03; 0,05) kullanılarak modifiye edilmiş ve üretilen nanokompozit membranların bulanık elma suyunun berraklaştırılmasında performansları değerlendirilmiştir. Membran deneyleri sonlu filtrasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretilen yeni nesil nanokompozit membranlar saf su akı değerleri, SEM ve yüzey temas açısı değerleri açısından karakterize edilmiştir. Aynı zamanda, üretilen PSF/PEI/SiO₂ yeni nesil nanokompozit membrandan elde edilen berrak elma suyu örnekleri renk (Pt-Co), bulanıklık (NTU) ve toplam suda çözünür kuru madde bakımından karakterize edilmiştir ve Döhler Gıda San. A.Ş.'den temin edilen berrak elma suyu örnekleri (Brix) ile bu parametreler açısından karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre %0,01 oranında SiO₂ ilave edilerek üretilen PSF/PEI/SiO₂ membranın en yüksek saf su akısına ve en yüksek hidrofilikliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bu membrandan elde edilen berrak meyve suyu örneği en yüksek renk ve toplam suda çözünür kuru madde sahipken aynı zamanda en düşük bulanıklık değeri ile elma suyu berraklaştırma deneylerinde de en iyi performansı sergilemiştir.

Anahtar kelimeler: nanokompozit membran, SiO₂ nanopartikül, berraklaştırma, elma suyu

FABRICATION OF PSF/SiO₂ NANOCOMPOSITE MEMBRANE AND APPLICATION IN APPLE JUICE CLARIFICATION PROCESS

ABSTRACT

In this study, PSF/PEI (20/2% w/w) membranes which were fabricated by using phase inversion method were modified with using SiO₂ nanoparticles at different concentrations (0.01, 0.03, 0.05% w/w) and performance of fabricated nanocomposite membranes were evaluated in clarification of turbid apple juice. Membrane experiments were conducted using dead-end filtration process. Fabricated new generation nanocomposite membranes were characterized in terms of pure water flux, SEM and water contact angle. Moreover, clarified apple juice samples obtained from fabricated PSF/PEI/SiO₂ new generation nanocomposite membranes were characterized in terms of color (Pt-Co), turbidity (NTU) and total soluble solid content (Brix) and these samples were compared to clarified apple juice samples supplied from Döhler Inc. in terms of these parameters. According to the obtained results, the membrane produced by adding 0.01% SiO₂ was determined as the membrane having the highest pure water flux and highest hydrophilicity. At the same time, this membrane showed the best performance in apple juice clarification experiments by producing apple juice which had the highest color and total solid matter content and lowest turbidity value.

Keywords: nanocomposite membrane, SiO₂ nanoparticle, clarification, apple juice

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ kevser.kahraman@agu.edu.tr ,

☎ (+90) 352 224 8800

☎ (+90) 352 338 8828

GİRİŞ

Gıda endüstrisinde meyve suyu üretimi ve konsantrasyonu meyvelerin yüksek oranda vitamin, mineral ve antioksidan içermesi, aynı zamanda yoğun lif içeriği ile sindirim sistemine yardımcı olmasından dolayı oldukça popüler hale gelmiştir. Meyve suları besin değeri açısından meyveye en yakın olan içecektir ve son yıllarda taze meyve tüketimi azalırken, meyve suyu ve diğer işlenmiş meyve tüketimi bir artış göstermektedir (Nighojkar vd., 2019). 2012 yılı verilerine göre meyve ve sebze suyu tüketimi artarak yaklaşık 46.8 milyar litreye ulaşmıştır (Cassano vd., 2011).

Meyve suyu ekstrasyonundan sonra elde edilen ürün, lif, selüloz, hemiselüloz, protopektin, nişasta ve lipidler gibi suda çözünmeyen molekülleri ve aynı zamanda pektin, protein ve polifenoller gibi kolloid makromolekülleri içermesinden dolayı bulanıktır (Hui vd., 2008). Ayrıca bu içeriklerin konsantrasyonu bulanıklık derecesini etkilemektedir (Vaillant vd., 2001). Meyve suyunun berraklaştırması işlemi, düşük vizkoziteli, daha parlak ve berrak ürün elde etmek için uygulanmaktadır. Berraklaştırma prosesi hem geleneksel yöntemlerle (enzim, durultma ajanları, vb.) hem de membran uygulamasıyla işletilebilmektedir. Membran işlemleri geleneksel işlemlerle karşılaştırıldığında, antosiyaninler, karotenoidler ve vitaminler gibi besleyici bileşenlerin ve kimyasal, biyolojik gibi bazı işlemlerden olumsuz olarak etkilenen renk, aroma, lezzet gibi duyuşsal parametrelerin korunması açısından önemli avantajlara sahiptir (Lipnizki, 2010). Meyve suyu berraklaştırma işleminde, UF membranlar, protein, tanen ve polisakaritlerin yanı sıra maya, küf, mikroskobik organizma ve kolloidleri uzaklaştırmak ve meyve suyunu konsantre etmek için kullanılmaktadır (Mohammad vd., 2012).

Membran prosesleri ürün kalitesi üzerine olumlu etkilerinin olmasının yanı sıra, uygulanması sırasında ortaya çıkan tıkanma problemleri ve yüksek enerji gereksinimi nedeniyle önemli bir dezavantaja sahiptir. Bu durumun önüne geçilmesi amacıyla meyve suyu sektöründe hali hazırda kullanılan ticari membranlara alternatif olarak, yüksek performanslı polimerik

membranların üretimi konusunda yapılan araştırmaların sayısının her geçen gün arttığı görülmektedir (Saleh ve Gupta, 2012). Membran üretiminde hedef, seçiciliği değiştirmeden taşınım hızını artırabilmek ve tıkanmayı engellemenin yollarını bulmaktır. Membran üretiminde yaygın olarak selüloz asetat, poliakrilonitril, polivinilalkol ve polisülfon (PSF) gibi polimerler kullanılmaktadır (Fenu vd., 2010; Kumar vd., 2013; van Reis ve Zydney, 2007; Vasanth vd., 2013). Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında PSF üstün kimyasal, ısıl ve mekanik özellikler göstermesi ve organik çözücülerle kolaylıkla çözünebilmesinden dolayı membran fabrikasyonunda en çok kullanılan malzemedir (Fenu vd., 2010). Literatürde PSF'in hidrofilitliğini arttırmak için polivinilpirolidin (PVP), polietilenglikol (PEG) ve polietilenimin (PEI) gibi por yapıcı ajanlar ile membrana hidrofilitlik kazandırmaya yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (Ba vd., 2009; Ma vd., 2011; Park vd., 2012; Sinha ve Purkait, 2013; Wu vd., 2014).

Bununla birlikte yüksek yüzey alanına sahip farklı nanopartiküllerin membran matriksine eklenmesi ile membranların hidrofilitliğinin artırılması ve tıkanma performanslarının geliştirilmesi de son yıllarda dikkat çeken uygulamalardır (Saleh ve Gupta, 2012). Membran performansı ve tıkanma direncinin geliştirilmesi için membran matriksine nanomalzeme eklenmesi ise yüksek verimli membran üretim teknolojilerinde yeni bir yaklaşımdır. Nanomalzemelerin temel amacı yüzey hidrofilitliğini artırmak ve membran tıkanmasını azaltmaya dayanır (Vanneste vd., 2011). Membran hidrofilitliği artırıldığında, membranın tıkanması yüzeydeki hidrofilitlik grupla su moleküllerinin arasında oluşan hidrojen bağına bağlı olarak azalmaktadır (Saleh ve Gupta, 2012). Bu amaçla, Baghbanzadeh vd. (2016) yaptıkları çalışmada membran matriksinde PSF polimeri ile farklı konsantrasyonlarda (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 wt%) grafen oksit nanopartikülü kullanmış ve yüzey teması açısındanki düşüş ve membran hidrofilitliğindeki artışın bir sonucu olarak su akısında artış gözlemlemişlerdir. Bir başka çalışmada hidrofilitlik titanyum nanotüp ile hazırlanan ince film kompozit membranların su akısı değerlerinin ticari membranlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Bagheri vd. 2016).

Ayrıca, Sun vd. (2018) grafen oksit membranı, SiO₂ nanopartikülü kullanarak modifiye etmiş ve SiO₂ nanopartikülünün membran morfolojisini değiştirerek saf su akısında artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Benzer olarak, Hosseini vd. (2018), SiO₂ kullanarak modifiye ettikleri nanokompozit membranları sulu çözülden boya uzaklaştırmak için kullanmışlar ve SiO₂ nanopartikülü ilavesinin membran termokimyasal özelliklerini geliştirdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, SiO₂ nanopartikül ilavesinin saf su akısının MF membranlar kadar artırdığını, aynı zamanda membranların boya açısından geçirgenliğinin de membranlar kadar az olduğunu belirtmişlerdir. Literatürde SiO₂ nanopartikül kullanılarak modifiye edilmiş yeni nesil nanokompozit membranların meyve suyu berraklaştırma prosesinde uygulanması ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yukarıda verilen bilgiler ışığında, bu çalışmada faz dönüşümü yöntemi kullanılarak üretilen PSF/PEI (%20/2, w/w) membranlar, farklı konsantrasyonlarda SiO₂ nanopartikülü (% 0,01, 0.03, 0.05) kullanılarak modifiye edilmiş ve üretilen nanokompozit membranların performansları Döhler Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti.'den temin edilen bulanık elma suyunun berraklaştırılmasında değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma kapsamında kullanılan bulanık elma suyu örneği (S1) Döhler Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti.

(Karaman)'den temin edilmiştir. Ayrıca, firmanın bu çalışmada üretilen membranlara alternatif olarak proseste kullanmakta olduğu UF membran prosesi sonrası elde ettiği berrak elma suyu da (S2) karşılaştırma amacıyla temin edilmiştir.

Nanokompozit membran üretimi

Yeni nesil nanokompozit UF membranlar faz dönüşümü yöntemi kullanılarak 100±0,2 µm kalınlığında üretilmiştir. UF membranların üretiminde kullanılan PSF (Polisülfon, MA 60.000, Acros Organics) ve PEI (Polietilenimin, MA 25.000, Sigma-Aldrich, USA) polimerlerinin konsantrasyonları Saki ve Uzal'ın çalışmasına göre ayarlanmıştır (Saki ve Uzal, 2018). PSF/ SiO₂ UF membranların üretiminde ağırlıkça %20 PSF, %2 PEI ve ağırlıkça farklı konsantrasyonlarda (%0,01; %0,03; %0,05), SiO₂ nanopartikülü (Nanografi, Türkiye) kullanılmıştır. Üretilen membranların kompozisyonları Çizelge 1'de gösterilmiştir. Belirtilen kompozisyonlarda tartılan bileşenler, 70:30 oranındaki NMP ve DMF çözültisinde manyetik karıştırıcı kullanılarak, 400 rpm'de 12 saat boyunca karıştırılarak çözdürülmüştür. Hazırlanan çözültilerdeki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için membran yapımı öncesi 2 saat ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Hazırlanan membranlar saf su içerisinde 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 1. PSF/PEI/SiO₂ nanokompozit UF membranların kompozisyonları
Table1. Compositions of PSF/PEI/SiO₂ nanocomposite UF membranes

Membran Membrane	PSF (wt%)	PEI (wt%)	SiO ₂ (wt%)
UF1	20	-	-
UF2	20	2	-
UFS1	20	2	0.01
UFS3	20	2	0.03
UFS5	20	2	0.05

UF1: %20 PSF; UF2: %20PSF/%2PEI; S: SiO₂; 1, 3, 5: %0,01, 0.03, 0.05 membran matriksine ilave edilen nanopartikül oranı

UF1: 20% PSF; UF2: 20%PSF/2%PEI; S: SiO₂; 1, 3, 5: %0.01, 0.03, 0.05 nanoparticle incorporation ratios

Membran karakterizasyonu

Elektron taramalı mikroskop (SEM)

Membran kesit ve yüzey morfolojisi ile ilgili nano ölçekte bilgi almak için SEM (Zeiss Leo 440, Almanya) analizi gerçekleştirilmiştir. Membran yüzey alanları 1 cm² olacak şekilde kesilerek ölçüm öncesi JEOL JFC 1600 kullanılarak platin ile kaplanmıştır. Analizler 25 kV altında gerçekleştirilmiştir.

Yüzey temas açısı ölçer

Membranların hidrofilik özelliği yüzey temas açısı ölçer (Attention-Theta Lite, Biolin Scientific, Finlandiya) kullanılarak belirlenmiştir. Cihaza yerleştirilen membranların yüzeyine mikro şırınga kullanılarak 5 µL su damla şeklinde damlatılmıştır. Ölçüm sırasında “sessile drop” metodu kullanılmış ve ölçüm oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Membran yüzeyindeki üç farklı noktada yüzey temas açısı ölçümü gerçekleştirilmiş ve ortalama değerleri kaydedilmiştir.

Sonlu filtrasyon

Üretilen yeni nesil nanokompozit membranların saf su akışı ve meyve suyu berraklaştırma performansının tayini için, net filtrasyon alanı 14,6 cm² olan ve 300 mL besleme haznesine sahip, sonlu filtrasyon membran modülü (Sterlitech, HP4750, ABD) kullanılmıştır. Membran örnekleri besleme haznesinin altına yerleştirilmiş ve hazne 250 mL örnek ile doldurulmuştur (saf su/bulanık elma suyu). Filtrasyon deneyi için gerekli olan basınç sıkıştırılmış N₂ gazından elde edilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında (25±3°C) yapılmıştır. Karıştırıcı hızı 250 rpm olarak ayarlanmış ve basınç Döhler Ltd. Şti. tarafından kullanılan basınç ile uyumlu olacak şekilde, 5,4 bar olarak ayarlanmıştır. Saf su için membrandan geçen süzüntü belirli aralıklarla 10 mL'lik dereceli silindire toplanarak akışı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır;

$$J_w = \frac{V}{A \times t}$$

Burada J, saf su akışını, A membran filtrasyon alanını (m²), V elde edilen süzüntü hacmini (L), t ise süreyi (sa) ifade etmektedir.

Elma Suyu Karakterizasyonu

Renk ölçümü

Örneklerin renk parametresi ASTM metod No: 1209'a göre (ASTM, 2001) RFID teknolojisine sahip spektrofotometre (Hach, DR 6000, Almanya) kullanılarak 465 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülerek belirlenmiş ve renk değerleri Pt-Co renk birimi cinsinden belirlenmiştir. Ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve ortalama değerleri verilmiştir.

Bulanıklık tayini

Elma suyu örneklerinin bulanıklık tayini türbidimetre (Thermo Scientific, Eutech TN-100, Singapur) kullanılarak He vd (2007) tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiş ve sonuçlar NTU cinsinden ifade edilmiştir. Cihazın kalibrasyon ayarı her ölçüm öncesinde yapılmıştır. Ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve ortalama değerleri verilmiştir.

Suda çözünür kuru madde tayini

Örneklerdeki toplam suda çözünür kuru madde miktarı refraktometre (Abbe ATAGO, DR-A1, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir ve değerler °Brix cinsinden ifade edilmiştir. (He vd., 2007) Bu amaçla 100 µL elma suyu örnekleri refraktometre yüzeyine damlatılmış ve ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Üretilen membranların yüzey temas açısı değerleri, ve üretilen berrak elma suyu örneklerinin bulanıklık, renk ve toplam suda çözünür katı madde içerikleri açısından karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Örnekler arasındaki bu farklılığı belirtmek için Duncan testi uygulanmıştır.

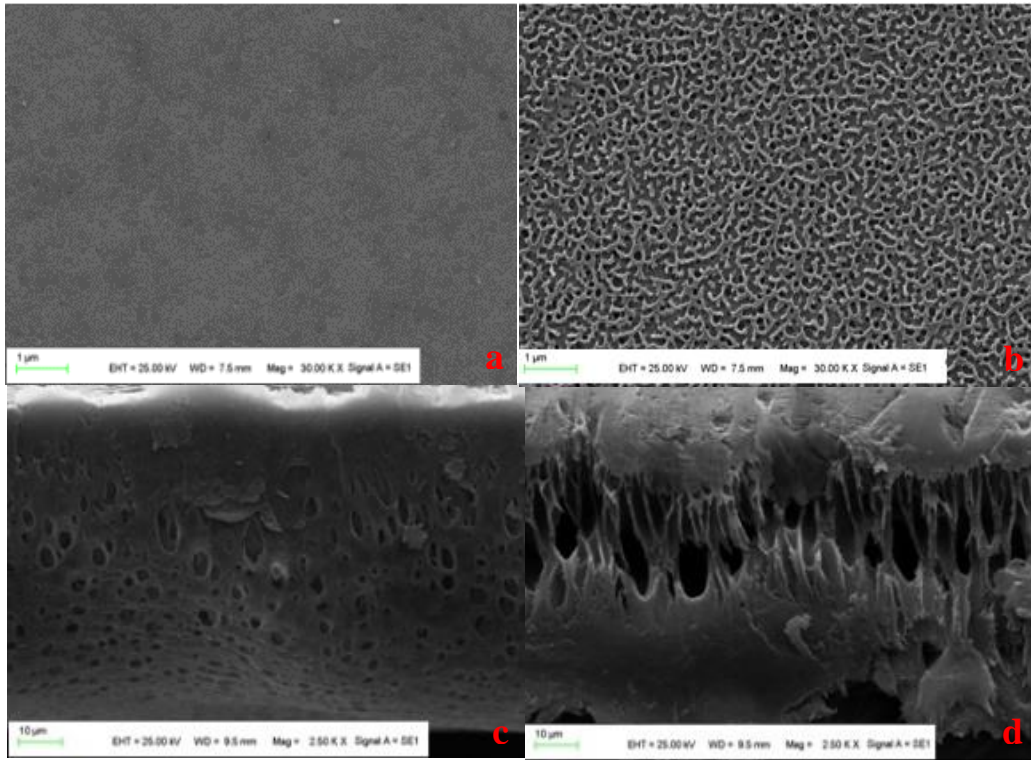
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

PSF/PEI /SiO₂ Nanokompozit Membranların Karakterizasyonu SEM

Membranların morfolojik özelliklerinin bilinmesi filtrasyon performanslarının değerlendirilmesinde yol göstermesi açısından oldukça önemlidir. Üretilen nanokompozit membranların yapısına PEI ve SiO₂ nanopartikülü eklenmesiyle elde edilen membran yüzey ve yan kesitindeki

morfolojik değişimler SEM analizi ile belirlenmiştir. Bu çalışmada, üretimi gerçekleştirilen nanopartikül eklenilmemiş UF1 (%20 PSF) ve UF2 (%20 PSF/%2 PEI) membranların yüzey ve yan kesit yapıları Şekil 1'de verilmiştir. Yalnızca PSF kullanılarak üretilen membranın (UF1) yüzeyi pürüzsüz bir yapıya sahipken (Şekil 1a), membran matrisine PEI eklenmesiyle membran yüzey yapısı tamamen değişerek küçük porların olduğu gözlenmektedir (Şekil 1b). Membran örneklerinin yan kesit görüntülerinde de benzer şekilde değişiklikler gözlenmiştir. PSF içeren membranın yan kesiti gözeneksiz yapıya sahipken (Şekil 1c), membran

matrisine PEI eklenmesiyle küçük gözenekler oluşmuştur (Şekil 1d). PSF'in yoğun yapısı morfolojik olarak mekanik dayanımına katkı sağlamaktadır. Yalnızca PSF içeren membranın yan kesitinde sıkı alt ve üst tabakanın arasında makro düzeyde gözenek yapıları oluşurken (Şekil 1c), PEI'nin gözenek oluşturma kabiliyetinden dolayı yeni mikro düzeyde gözenekler görülmektedir (Şekil 1d). Bu sonuçlarla benzer şekilde literatürde polimerik membran matrisine PEI eklenmesiyle membran yüzey ve yan kesitinde yeni porların gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır (Costa vd., 1999; Uzal vd., 2017).



Şekil 1. PSF ve PSF/PEI membranları SEM görüntüleri (a) UF1 (%20 PSF) yüzey görüntüsü (b)UF2 (%20 PSF) yüzey görüntüsü (c) UF1 (%20 PSF/%2 PEI) yan kesit görüntüsü (d) UF2 (%20 PSF/%2 PEI) yan kesit görüntüsü

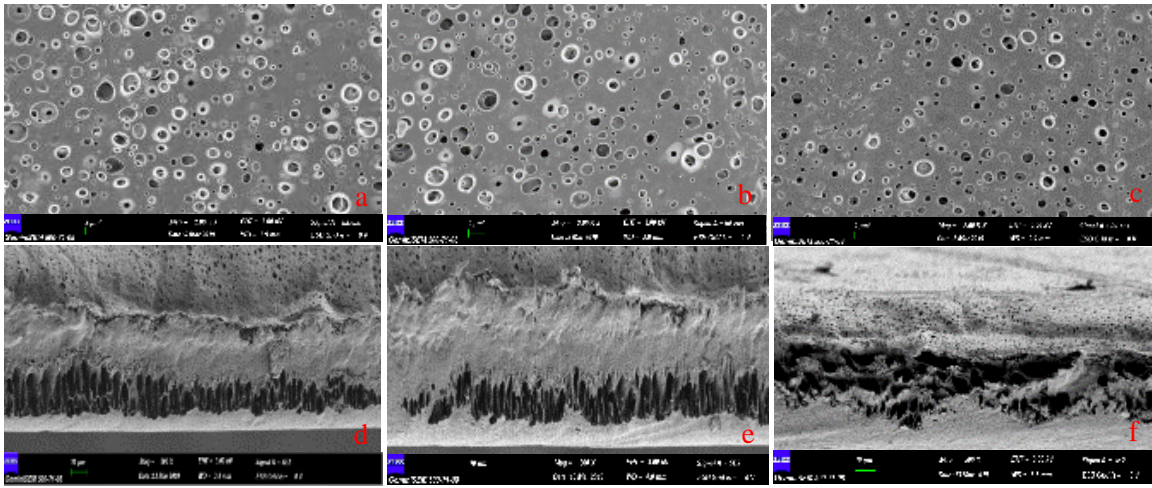
Figure 1. SEM images of PSF and PSF/PEI membranes (a) UF1 (20%PSF) (b) UF2 (20%PSF/2%PEI), (c) Cross-section of UF1 (20%PSF), (d) Cross-section of UF2 (20%PSF/2%PEI)

PSF/PEI matrisine farklı konsantrasyonlarda SiO₂ (%0,01; 0.03; 0.05) eklenmesi ile elde edilen nanokompozit membranların yüzey ve yan kesit SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir. Membran matrisine SiO₂ nanopartikülü eklenmesiyle

membran yüzeyinde oluşan makro porların yerini (Şekil 2a) daha homojen dağılan mikro ve makro porlar almaktadır. Membran yüzeyinde oluşan bu düzenli dağılım ile membran porozitesi ve buna bağlı olarak da membran akı değerlerinin

iyileşeceği düşünülmektedir. Ayrıca yan kesit görüntülerine göre, SiO_2 nanopartikülü kullanılarak modifiye edilen membranların yan kesit görüntüleri membran matrisine eklenen SiO_2 nanopartikülünün konsantrasyonuna göre farklılık göstermektedir. % 0,01 ve %0,03 oranında SiO_2 nanopartikülü ilave edilerek üretilen membranların (sırasıyla UFS1, UFS3) üst ve alt tabakası arasında uzanan parmaklı por yapılar gözlemlenirken %0,05 oranında SiO_2 nanopartikülü ilave edilerek üretilen membranda (UFS5) bu yapılar gözlenmemiştir. Bu durum,

SiO_2 konsantrasyonunun artması ile nanopartiküllerin topaklaşarak yüzey alanı azalmasına neden olduğu ve membran yapısındaki parmak benzeri porların oluşumunu azalttığı şeklinde değerlendirilmektedir. Benzer şekilde Sun vd. (2018)'nin çalışmasında da membran matrisine SiO_2 nanopartikülü eklenmesiyle membran yan yüzeyinde porların oluştuğu gözlemlenmiş ve bu porların membran kalınlığının artmasına neden olduğu belirtilmiştir. Oluşan bu porların akı üzerine olumlu etki yaptığı da belirtilmiştir.



Şekil 2. PSF/PEI/ SiO_2 membranlar için SEM görüntüleri (a) UFS1 yüzey görüntüsü (b) UFS3 yüzey görüntüsü (c) UFS5 yüzey görüntüsü (d) UFS1 yan kesit görüntüsü (e) UFS3 yan kesit görüntüsü (f) UFS5 yan kesit görüntüsü, S: SiO_2 ; 1,3,5: %0,01, 0,03, 0,05 membran matrisine ilave edilen nanopartikül yüzdesi

Figure 2. SEM images of PSF/PEI/ SiO_2 membranes. (a) UFS1 (b) UFS3 (c) UFS5 (d) Cross-section of UFS1 (e) Cross-section of UFS3 (f) Cross-section of UFS5. S: SiO_2 ; 1, 3, 5: 0.01, 0.03, 0.05 wt% nanoparticle incorporation ratios

Yüzey Temas Açısı

PSF/PEI/ SiO_2 nanokompozit UF membranların hidrofiliği yüzey temas açısı ölçümü ile belirlenip sonuçlar Çizelge 2'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre %20 oranında PSF kullanılarak üretilen saf PSF membran (UF1) en yüksek yüzey temas açısı değerine sahiptir. PEI ve SiO_2 nanopartikül ilavesi ile yüzey temas açısı değerlerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Yüzey temas açısı değerinin azalması hidrofilitikteki artışın bir göstergesidir. Yüksek oranda amin içeren PEI, hidrofilik özellikte artışa ve

membranların pozitif yüklenmesine neden olur (Albrecht vd., 2003; Trimpert vd., 2006). Bu çalışmada üretilen membranlar arasında %0,01 oranında SiO_2 nanopartikülü ilave edilerek üretilen membran (UFS1) en düşük yüzey temas açısı değerine ($76,6 \pm 6^\circ$) sahiptir. Membran hidrofiliği ile membran akısı arasında doğrudan bir ilişki vardır. Bu sonuçlarla benzer olarak, Sun vd. (2018) de SiO_2 nanopartikül ilavesinin membran hidrofiliğini artırdığını belirtmişlerdir.

Çizelge 2. UF membranların yüzey temas açısı değerleri

Membran Membrane	Yüzey temas açısı (°) Contact angle (°)
UF1	96.6±6 ^c
UF2	88.4±4 ^{b,c}
UFS1	76.6±6 ^a
UFS3	79.5±7 ^{a,b}
UFS5	88.7±2 ^{b,c}

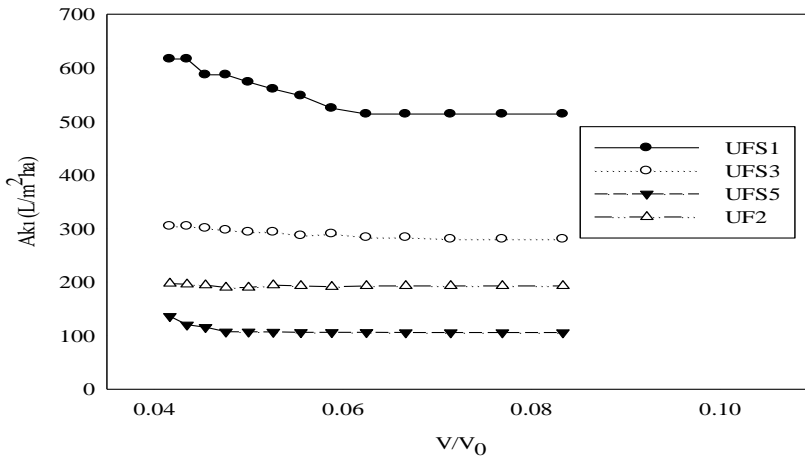
UF1: %20 PSF; UF2: %20PSF/%2PEI; S: SiO₂; 1, 3, 5: %0.01, 0.03, 0.05 membran matrisine ilave edilen nanomateryal oranı

Aynı sütündeki farklı harfler, örnekler arasında istatistiksel olarak farklılık olduğunu göstermektedir (P < 0.05)

UF1: 20% PSF; UF2: 20%PSF/2%PEI; S: SiO₂; 1, 3, 5: %0.01, 0.03, 0.05 nanoparticle incorporation ratios
For each sample, means with different letters within each column are significantly different (P < 0.05)

PSF/PEI/SiO₂ Membranların Filtrasyon Akısı

SiO₂ nanopartikül ilavesinin PSF/PEI membranların performansı üzerindeki etkisi, sonlu filtrasyon sistemi kullanılarak saf su akısı açısından analiz edilmiştir. Ağırlıkça %0.01; %0,03 ve %0.05 oranında SiO₂ nanopartikül ilavesi ile hazırlanan nanokompozit PSF/PEI UF membranların saf su akı değerleri Şekil 3'te gösterilmektedir. Yalnızca PSF kullanılarak hazırlanan membranın (UF1) saf su akısı 24 L/m²sa olarak belirlenmişken, PSF/PEI kullanılarak modifiye edilmiş membranın (UF2) saf su akısı 192 L/m²sa gibi oldukça yüksek değerlerde olup, artış göstermiştir. Makromoleküler yapıda olan PEI, membranın ana malzemesi olarak kullanılan polimerlerle reaktiflik göstermediği için por boyutlarının artmasını sağlamaktadır (Sun vd., 2011). Chiang vd. (2009) bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde, PEI kullanılarak modifiye edilen membranların büyük por boyutuna ve dolayısıyla yüksek filtrasyon akısına sahip olduğunu göstermişlerdir.



Şekil 3. PSF/PEI ve SiO₂ nanopartikülü içeren nanokompozit UF membranların saf su akıları. (TMP=5,4 bar, T= 25±5°C). UF2:%20PSF/%2PEI; S:SiO₂; 1, 3, 5: %0.01, 0.03, 0.05 membran matrisine ilave edilen nanopartikül oranı

Figure 3. Pure water flux values for PSF/PEI and SiO₂ nanoparticle incorporated nanocomposite UF membranes (TMP=5.4 bar, T= 25±5°C). S: SiO₂; 1, 3, 5: 0.01, 0.03, 0.05 wt% nanoparticle incorporation ratios

Şekil 3'te de görüleceği gibi, nanopartikül ilavesi genellikle PSF/PEI membranların saf su akışlarında artışa neden olmuştur. En yüksek akı değeri, %0.01 oranında SiO₂ nanopartikül ilave

edilerek üretilen membran (UFS1) kullanıldığında elde edilmiştir (514±15 L/m²sa).

Literatürde SiO₂ nanopartikül ilavesinin membran performansı üzerindeki etkisini araştıran çeşitli

çalışmalar bulunmaktadır. Hosseini vd. (2018), farklı konsantrasyonlarda SiO₂ içeren PVA (polivinil alkol) membranların saf su akısını incelemiş ve SiO₂ nanopartikülü içeren membranın saf su akısının, saf PVA membranın saf su akısından daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Sun vd. (2018) de SiO₂ nanopartikül ilavesinin membranın saf su akısını artırdığını belirtmişlerdir.

Elma Suyunun PSF/PEI/SiO₂ Membranlarla Berraklaştırılması

SiO₂ nanopartikül ilavesi ile üretilmiş yeni nesil PSF/PEI/SiO₂ nanokompozit membranlar

kullanılarak elde edilen berrak elma suyu örneklerinin renk, bulanıklık ve toplam suda çözünür kuru madde sonuçları Çizelge 3'te gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen berrak elma suyu örneklerinin yanı sıra Döhler Gıda San. A.Ş.'den temin edilen bulanık ve berrak elma suyu örneklerine ait sonuçlar da Çizelge 3'te verilmiştir. SiO₂ nanopartikül kullanılarak modifiye edilmemiş membranlardan elde edilen meyve sularının, modifiye edilmemiş membranlardan elde edilen berrak meyve suyuna göre daha yüksek renk ve suda çözünür kuru madde ve daha düşük bulanıklık değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Elma suyu örneklerinin renk, bulanıklık ve toplam suda çözünür kuru madde içeriği
Table 3. Color, turbidity and total soluble solid content of apple juice samples

Membran Membrane	Renk Color (PtCo)	Bulanıklık Turbidity (NTU)	Suda çözünür kuru madde madde Total soluble solid (°Brix)
UF1	424±5 ^a	12.2±2 ^d	11.4±0.1 ^a
UF2	628±8 ^b	7.4±1 ^c	12.8±0.2 ^b
UFS1	660±10 ^e	4.6±2 ^b	13.6±0.2 ^b
UFS3	634±9 ^c	6.3±2 ^{b,c}	13.4±0.7 ^b
UFS5	652±9 ^d	5.9±1 ^{b,c}	13.0±0.5 ^b
S2	754±7 ^f	0.34±0.3 ^a	16.2±0.6 ^c
S1	-	478±12 ^e	16.5±0.6 ^c

UF1: %20 PSF; UF2: %20PSF/%2PEI; S: SiO₂; 1, 3, 5: %0.01, 0.03, 0.05 membran matriksine ilave edilen nanopartikül oranı

S2: Döhler San. A.Ş.'den temin edilen berrak elma suyu. S1: Döhler Gıda San. A.Ş.'den temin edilen bulanık elma suyu

Aynı sütündeki farklı harfler, örnekler arasında istatistiksel olarak farklılık olduğunu göstermektedir (P < 0.05)

UF1: 20% PSF; UF2: 20%PSF/2%PEI; S: SiO₂; 1, 3, 5: %0.01, 0.03, 0.05 nanoparticle incorporation ratios

S2 (Döhler Inc.): clarified apple juice from Döhler Inc. S1 (Döhler Inc.): turbid apple juice from Döhler Inc

For each sample, means with different letters within each column are significantly different (P < 0.05)

Renk, elma suyu için tüketicinin kalite algısını etkileyen önemli bir parametredir. Döhler Gıda San. A.Ş.'den temin edilen bulanık elma suyu örneği (S1), spektrofotometrik ölçüm sırasında yanıltıcı sonuçlara neden olabilecek yüksek konsantrasyonda askıda katı madde içermesi nedeniyle renk analizinin dışında tutulmuştur. SiO₂ nanopartikülü kullanılarak modifiye edilen membranlardan elde edilen berrak elma suyunun saf PSF ve PSF/PEI membranlara göre daha yüksek renk yoğunluğuna sahip oldukları gözlemlenmiştir. SiO₂ nanopartikül ilavesi ile

modifikasyonun, membranların porozite ve por büyüklüğü özelliklerinin artmasına neden olarak, membranların geçirgenliğini artırdığı ve daha fazla renk pigmentinin geçişini sağladığı düşünülmektedir.

Yeni nesil PSF/PEI/SiO₂ nanokompozit membran kullanılarak elde edilen berrak meyve suyu örnekleri arasında, en yüksek renk yoğunluğu (660 Pt-Co) %0.01 oranında SiO₂ nanopartikülü ilave edilerek üretilen membran (UFS1) kullanılarak elde edilmiştir. Ancak bu değer

Döhler Gıda San. A.Ş.'den temin edilen berrak elma suyuna göre daha düşük bulunmuştur.

Döhler Gıda San. A.Ş.'den temin edilen bulanık elma suyu örneğinin (S1) bulanıklık değeri 478 NTU olarak ölçülmüştür. PSF/PEI/SiO₂ nanokompozit membran uygulaması ile beklendiği gibi, elma suyu örneklerinin bulanıklık değerleri önemli ölçüde azalmıştır. Elde edilen berrak elma suyu örneklerinin bulanıklık ölçüm sonuçları kıyaslandığında SiO₂ nanopartikülü kullanılarak modifiye edilmiş membranlardan elde edilen örneklerin, yalnızca PSF kullanılarak hazırlanan membran (UF1) ve PEI kullanılarak modifiye edilmiş membran (UF2) kullanılarak elde edilen elma suyu örneklerine göre daha düşük bulanıklık değerine sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bu, nanopartikül ile modifiye edilmiş membranların daha iyi tutma özelliğine sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara benzer olarak, Ngo vd. (2016) TiO₂ nanopartikül eklenmesi UF membranlarının tutma kapasitesini artırdığını bildirmiştir. Bruijn vd (2003)'ne göre ticari elma suyu örneklerinin bulanıklık değeri 5 NTU'dan az olmalıdır. UFS1 kullanılarak elde edilen berrak elma suyu örneğinde 4.6 NTU değeri ile bu sınırın altında sonuç elde edilmiştir. Ancak, bu değer Döhler Gıda San. A.Ş.'den temin edilen berrak elma suyu örneği (0.34 NTU) ile karşılaştırıldığında daha yüksektir. Başka bir çalışmada ticari membran (Carbosep®) kullanılarak berraklaştırılmış elma suyunun türbiditesi 1.8 NTU olarak bulunmuştur (De Bruijn vd., 2003).

Toplam suda çözünür kuru madde içeriği S1 ve S2 için sırasıyla 16,5 °Brix ve 16,2 °Brix olarak belirlenmiştir. Üretilen PSF/PEI/SiO₂ nanokompozit UF membranlar kullanılarak berraklaştırılan örneklerin tamamı, S2 örneğine göre düşük toplam suda çözünür kuru madde içeriğine sahiptir. Bununla birlikte, bütün örnekler ticari şartnamede belirtilen berrak elma suyu toplam suda çözünür kuru madde içeriğine ($\geq 10^\circ\text{Brix}$) sahiptir (De Bruijn vd., 2003). Elde edilen berrak elma suyu örnekleri, arasında, %0.01 oranında SiO₂ nanopartikülü ilave edilerek üretilen membran (UFS1) kullanılarak elde edilmiş berrak elma suyu örneği 13,6 °Brix değeri ile en yüksek

suda çözünür kuru madde içeriğine sahiptir. Bu sonuçlara benzer olarak, Pap vd. (2012), membran filtrasyonuna tabi tuttıkları siyah frenküzümü suyunun toplam suda çözünür kuru madde miktarının 15°Brix'den 14°Brix'e düştüğünü gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Gulec vd. (2017) üç farklı UF membran (US100, UH050 ve UC030) kullanarak berraklaştırdıkları elma suyu örneklerinin toplam suda çözünür kuru madde içeriğinin 11.9 °Brix'den, sırasıyla 9, 8,8, 9,7 °Brix'e düştüğünü belirtmişlerdir.

SONUÇ

Bu çalışmada, SiO₂ nanopartikülü kullanılarak yeni nesil PSF bazlı nanokompozit UF membranlar üretilmiş ve bu membranlar sonlu filtrasyon sistemi kullanılarak elma suyu berraklaştırması işleminde kullanılmıştır. Üretilen membranların performansı, hem membranların fizikokimyasal özellikleri açısından hem de elde edilen meyve suyu örneklerinin karakterizasyonu gerçekleştirilerek elma suyu berraklaştırması açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen membran karakterizasyon sonuçlarına göre gözenek oluşturucu olarak kullanılan polimer PEI ilavesi ile PSF membranın saf su akısının ve hidrofilikliğin arttığı tespit edilmiştir. Saf PSF membran için 24 L/m²sa olan saf su akı değeri, membran matrisine PEI ilavesi ile 192 L/m²sa değerine ulaşmıştır. Ayrıca, PEI ilavesi ile PSF membranın temas açısı değeri 96.6°den 88.4°e düşmüştür. Üretilen PSF/PEI/SiO₂ nanokompozit membranlar arasında %0.01 oranında SiO₂ nanopartikül ilave edilerek üretilen membranın (UFS1) en yüksek hidrofilikliğe (en düşük temas açısı) ve saf su akı değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, SEM görüntüleri de, PEI'nin ve SiO₂ nanopartikülünün membran matrisine tutunduğunu ve membran yüzey ve yan kesit morfolojisinde olumlu değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan elma suyu karakterizasyon sonuçlarına göre membran performansı kıyaslandığında, PSF/PEI/%0.01SiO₂ membranı kullanılarak üretilen berrak elma suyunun diğer membranlara göre, en iyi sonuçları verdiği ve 4.6 NTU bulanıklık, 660 Pt-Co renk ve 13.6 mg/L suda çözünür kuru madde sahip olduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Abdullah Gül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından FCD-2017-92 No'lu proje ile desteklenmiştir. Bu çalışmadaki meyve suyu örneklerinin teminindeki desteğinden ötürü Döhler Gıda San. ve Tic. Ltd. Şti.'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Albrecht, W., Seifert, B., Weigel, T., Schossig, M. (2003). Amination of poly(ether imide) membranes using di- and multivalent amines. *Macromolecular ChemPhysics*, 204(3), 510–521.

ASTM D1209-05(2019). Standard Test Method for Color of Clear Liquids (Platinum-Cobalt Scale). ASTM International, West Conshohocken, PA, 2019, www.astm.org

Ba, C., Langer, J., Economy, J. (2009). Chemical modification of P84 copolyimide membranes by polyethylenimine for nanofiltration. *J Membrane Sci*, 327(1–2), 49–58.

Baghbanzadeh, M., Rana, D., Lan, C. Q., Matsuura, T. (2016). Effects of Inorganic Nano-Additives on Properties and Performance of Polymeric Membranes in Water Treatment. *Separation & Purification Reviews*, 45(2), 141–167.

Bagheri, H., Baktash, M. Y., Jahandar, K. (2016). Electrospun superhydrophobic polystyrene hollow fiber as a probe for liquid–liquid microextraction with gas chromatography-mass spectrometry". *J Separation Sci*, 39(19), 3782–3788.

Cassano, A., Conidi, C., Drioli, E. (2011). Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) using membrane processes. *J Food Eng*, 107(3–4), 366–373.

Costa, T. M. H., Gallas, M. R., Benvenuti, E. V., da Jornada, J. A. H. (1999). Study of Nanocrystalline γ -Al₂O₃ Produced by High-Pressure Compaction. *J Physical Chem B*, 103(21), 4278–4284.

De Bruijn, J. P. F., Venegas, A., Martínez, J. A., Bórquez, R. (2003). Ultrafiltration performance of Carbosep membranes for the clarification of apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 36(4), 397–406.

Fenu, A., Guglielmi, G., Jimenez, J., Spérandio, M., Saroj, D., Lesjean, B., Nopens, I. (2010). Activated sludge model (ASM) based modelling of membrane bioreactor (MBR) processes: A critical review with special regard to MBR specificities. *Water research* (C. 44).

He, Y., Ji, Z., Li, S. 2007. "Effective clarification of apple juice using membrane filtration without enzyme and pasteurization pretreatment". *J Separation and Purification Techn*, 57, 366–373.

Hong, T., Ngo, A., The, D., Dinh, K., Thi, T., Nguyen, M. (2016). Advanced Materials and Devices Surface modification of polyamide thin film composite membrane by coating of titanium dioxide nanoparticles. *J Sci: Advanced Materials and Devices*, 1(4), 468–475.

Hosseini, S. A., Vossoughi, M., Mahmoodi, N. M., Sadrzadeh, M. (2018). Efficient dye removal from aqueous solution by high-performance electrospun nanofibrous membranes through incorporation of SiO₂ nanoparticles. *J Cleaner Production*, 183, 1197–1206.

Hui, Y. H., Barta, J., Cano, M. P., Gusek, T. W., Sidhu, J. S., Sinha, N. (2008). *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. <https://books.google.com.tr/books?id=Vu8gsgLeW-YC>

Kumar, R., Isloor, A. M., Ismail, A. F., Rashid, S. A., Ahmed, A. Al. (2013). Permeation, antifouling and desalination performance of TiO₂ nanotube incorporated PSf/CS blend membranes. *Desalination*, 316, 76–84.

Lipnizki, F. (2010). Cross-Flow Membrane Applications in the Food Industry. In: *Membrane Technology: Volume 3: Membranes for Food Applications*. Wiley.

Ma, Y., Shi, F., Ma, J., Wu, M., Zhang, J., Gao, C. (2011). Effect of PEG additive on the morphology and performance of polysulfone ultrafiltration membranes. *Desalination*, 272(1), 51–58.

Mohammad, A. W., Ng, C. Y., Lim, Y. P., Ng, G. H. (2012). Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane

- Fouling, and Fouling Control. *Food Bioprocess Technol*, 5(4), 1143–1156.
- Nighojkar, A., Patidar, M. K., Nighojkar, S. (2019). 8-Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. A. M. Grumezescu & A. M. B. T.-P. and S. of B. Holban (Ed.) (ss. 235–273). Woodhead Publishing.
- Park, S.-J., Cheedrao, R. K., Diallo, M. S., Kim, C., Kim, I. S., Goddard, W. A. (2012). Nanofiltration membranes based on polyvinylidene fluoride nanofibrous scaffolds and crosslinked polyethyleneimine networks. *J Nanoparticle Research*, 14(7), 884.
- Saki, S., Uzal, N. (2018). Preparation and characterization of PSF/PEI/CaCO₃ nanocomposite membranes for oil / water separation, 25315–25326.
- Saleh, T. A., Gupta, V. K. (2012). Synthesis and characterization of alumina nano-particles polyamide membrane with enhanced flux rejection performance. *Separation and Purification Technology*, 89, 245–251.
- Sinha, M. K., Purkait, M. K. (2013). Increase in hydrophilicity of polysulfone membrane using polyethylene glycol methyl ether. *J Membrane Sci*, 437, 7–16.
- Sun, J., Bi, H., Su, S., Jia, H., Xie, X., Sun, L. (2018). One-step preparation of GO/SiO₂ membrane for highly efficient separation of oil-in-water emulsion. *Journal of Membrane Science*, 553, 131–138.
- Sun, S. P., Hatton, T. A., Chung, T. S. (2011). Hyperbranched polyethyleneimine induced cross-linking of polyamide-imide nanofiltration hollow fiber membranes for effective removal of ciprofloxacin. *Environ Science and Technol*, 45(9), 4003–4009.
- Trimpert, C., Boese, G., Albrecht, W., Richau, K., Weigel, T. (2006). Poly(ether imide) membranes modified with poly(ethylene imine) as potential carriers for epidermal substitutes, *Macromolecular Bioscience*, 6(4), 274–284.
- Uzal, N., Ates, N., Saki, S., Bulbul, Y. E., Chen, Y. (2017). Enhanced hydrophilicity and mechanical robustness of polysulfone nanofiber membranes by addition of polyethyleneimine and Al₂O₃ nanoparticles. *Separation and Purification Technology*, 187, 118–126.
- Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M., Reynes, M. (2001). Strategy for economical optimization of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *J Food Eng*, 48(1), 83–90.
- Van Reis, R., Zydney, A. (2007). Bioprocess membrane technology. *J Membrane Sci*, 297(1), 16–50.
- Vanneste, J., Sotto, A., Courtin, C. M., Van Craeyveld, V., Bernaerts, K., Van Impe, J. (2011). Application of tailor-made membranes in a multi-stage process for the purification of sweeteners from *Stevia rebaudiana* *J Food Eng*, 103(3), 285–293.
- Vasanth, D., Pugazhenth, G., Uppaluri, R. (2013). Cross-flow microfiltration of oil-in-water emulsions using low cost ceramic membranes. *Desalination*, 320, 86–95.
- Wu, D., Huang, Y., Yu, S., Lawless, D., Feng, X. (2014). Thin film composite nanofiltration membranes assembled layer-by-layer via interfacial polymerization from polyethylenimine and trimesoyl chloride. *J Membrane Sc*, 472, 141–153.

ADAÇAYI UÇUCU YAĞ ELDESİNDEN SONRA ARTA KALAN ÜRÜNLERİN BİYOAKTİF POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Yasemin İncegöl^{1*}, Mustafa Çam²

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

²Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri, Türkiye

Geliş / Received: 06.02.2019; Kabul / Accepted: 24.06.2019; Online baskı / Published online: 19.07.2019

İncegöl, Y., Çam, M. (2019). Adaçayı uçucu yağ eldesinden sonra arta kalan ürünlerin biyoaktif potansiyellerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (4): 629-640 doi: 10.15237/gida.GD19038

İncegöl, Y., Çam, M. (2019). Determination of the bioactive potentials of sage (*Salvia officinalis* L.) by product after removal of essential oil. *GIDA* (2019) 44 (4): 629-640 doi: 10.15237/gida.GD19038

ÖZ

Adaçayı (*Salvia officinalis* L.), bitkisel çay, baharat ve gıda tatlandırıcısı olarak kullanılan, çok sayıda biyoaktif bileşen içeren, *Lamiaceae* familyasından önemli bir tıbbi bitkidir. Bu çalışmada, hidrodistilasyon ile adaçayı uçucu yağları uzaklaştırılıp, arta kalan sulu kısım ve atık yaprakların bileşimi incelenmiştir. Kurutulmuş adaçayı yaprakları 1 ve 2 saat olarak hidrodistilasyon yöntemi ile ekstrakte edilip arta kalan yapraklar tekrar kurutulmuş sırasıyla etil asetat ve etanol çözümleri ile Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen sulu (Hidrosol1, Hidrosol2), etanolü (Etanol1, Etanol2) ve etil asetatlı (Etilasetat1, Etilasetat2) ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid içerikleri, α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri, DPPH, ABTS ve β -karoten ağartma metodları kullanılarak antioksidan aktiviteleri kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Test edilen ekstraktlar arasında toplam fenolik madde miktarı (60.63 mg GAE/g), toplam flavonoid miktarı (40.23 mg KE/g), radikal süpürme gücü ((DPPH (95.00 mg TEAC/g) ve ABTS (92.00 mg TEAC/g)) açısından en yüksek değer 2 saat hidrodistilasyon sonucu elde edilen Hidrosol2 örneğine ait bulunurken en yüksek antidiyabetik aktivitenin IC₅₀ (1.32) Etil asetat1 örneğine ait olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Adaçayı, ekstraksiyon, fenolik, antioksidan, antidiyabetik

DETERMINATION OF THE BIOACTIVE POTENTIALS OF SAGE (*SALVIA OFFICINALIS* L.) BY PRODUCT AFTER REMOVAL OF ESSENTIAL OIL

ABSTRACT

Sage (*Salvia officinalis* L.) is an important medicinal plant of the *Lamiaceae* family, which is contains many bioactive components and is used as herbal tea, spice and food seasoning. In this study, the essential oils of sage were removed by hydrodistillation and the composition of the remaining residual floral water and waste leaves were investigated. Dried sage leaves were extracted with hydrodistillation method for 1 and 2 hours and the remaining leaves were dried again and subjected to Soxhlet extraction first with ethyl acetate and then ethanol. Total phenolic, flavonoid contents, α -glucosidase inhibition activities and antioxidant activities by using DPPH, ABTS, and β -carotene methods in aqueous (Hydrosol1, Hydrosol2), ethanolic (Ethanol1, Ethanol2) and ethyl acetate (Ethyl acetate1, Ethyl acetate2) extracts were determined by colorimetric methods. Among the different extracts tested, Hydrosol2, obtained from 2 h distillation, displayed the highest scores in terms of the total amount of phenolics (60.63 mg GAE/g), the total flavonoid content (40.23 mg CE/g), radical scavenging power ((DPPH (95.00 mg TEAC/g) and ABTS (92.00 mg TEAC/g)), while the highest antidiabetic activity (as IC₅₀ value) was determined in Ethyl acetate1 sample as 1.32.

Keywords: Sage, extraction, phenolic, antioxidant, antidiabetic

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ yaseminincegul@sdu.edu.tr,

☎ (+90) 246 211 16 32

☎ (+90) 246 237 08 59

GİRİŞ

Türkiye, zengin florası ile birçok tıbbi ve aromatik bitkiye ev sahipliği yapmaktadır. İnsanlığın varoluşundan beri, bitkiler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), dünyada yaklaşık 4 milyar insanın sağlık sorunlarını ilk etapta bitkisel ilaçlarla gidermeye çalıştıklarını bildirmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011). Bitkilerin ürettiği primer ve sekonder metabolitler ilaç endüstrisinin en temel bileşenleridir. Tıbbi ve aromatik bitkiler çok büyük bir sınıfları kapsamakta ve genel olarak bünyelerinde bulundukları etken madde, kullanım alanı ve farmakolojik etkilerine göre sınıflandırılmaktadırlar (Bayram vd., 2010). Adaçayı (*Salvia officinalis*) Ballıbabagiller (*Lamiaceae*) familyasına ait hoş kokulu, tek, iki veya çok yıllık otsu veya çalimsı bitkilerdir. Uçucu yağlar, alkoloider ve tanenler bitki bünyesinde bulunan etken maddelerin bazı önemli gruplarıdır (Şenkal vd., 2016). *Salvia officinalis* bitkisinin yaprakları, çiçekleri ve uçucu yağı kullanılan kısımlarıdır. Yapraklarda bulunan salgı tüyleri uçucu yağların yoğun olarak bulunduğu kısımdır ve yağ oranı % 0.5-2.5 aralığındadır. Tıbbi adaçayı uçucu yağının en önemli bileşenleri α -tuyon, β -tuyon, 1,8-sineol ve kamfordur. Uçucu yağın α -tuyon oranı % 1-45, β -tuyon oranı % 1-40 ve kamfor oranı % 0.4-44 olarak belirlenmiştir (Başyigit ve Baydar, 2017). Adaçayı içerdiği flavonoid, fenolik glikozit, fenolik asit türevleri ve uçucu yağ bileşenleri sayesinde antioksidan ve antimikrobiyal özellik göstermektedir (Torun vd., 2008; Emir Çoban ve Patır, 2010). Yürütülen çalışmalarda adaçayı antioksidan özelliğinin, karnosik asit, rosmarinik asite ilaveten flavonoidler, terpenler ve fenolik asitlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Lu ve Yeap Foo, 2001).

Adaçayı, gerek geleneksel demleme yöntemiyle gerekse süzen poşet şeklinde bitkisel çay olarak tüketimine ek olarak uçucu yağları da ayrıldıktan sonra değişik amaçlarla da kullanılan bir üründür. Ancak uçucu yağ uzaklaştırıldıktan sonra arta kalan kısım biyolojik öneme sahip fenolik madde, aminoasit ve monosakkarit türevleri içermektedir (Torun vd., 2008). Sulu kısımda bulunan materyaller biyolojik olarak aktif bileşikler

oldukları için atık olarak değil gıda, ilaç, kozmetik gibi sektörlerde yardımcı madde olarak değerlendirilmeye uygun gözükmektedir. Bu çalışma ile, adaçayı uçucu yağları alındıktan sonra arta kalan sulu kısmın ve atık yaprakların biyolojik potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

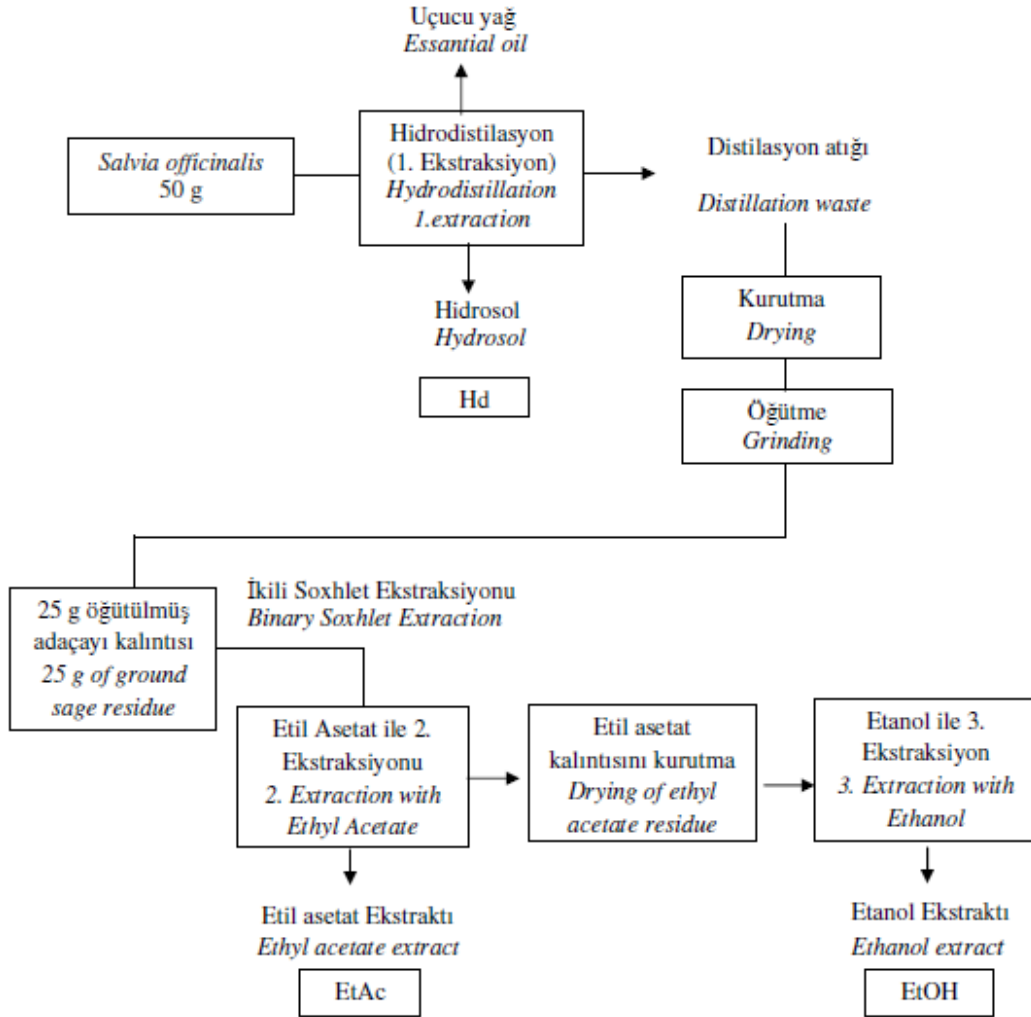
Çalışmada kullanılan adaçayı (*Salvia L.*) ulusal çapta bayilikleri bulunan Arifoğlu firmasından kuru formda temin edilmiştir. Bitkisel materyaldeki kusurlu yapraklar ayıklanmış ve saplarından ayrılarak kullanılmıştır.

Bitkisel Materyalin Ekstraksiyonu

50 g adaçayı yaprağı üzerine 500 mL saf su eklenerek Clevenger düzeneğinde 1 ve 2 sa hidrodilasyon işlemi uygulanarak sulu ekstraktlar (Hd₁ ve Hd₂) elde edilmiş ve hacimleri saf su ile 350 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen retant (adaçayı yaprakları) 50 °C'de etüvde kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş yapraklardan 25 g tartılıp üzerlerine 250 mL etil asetat (EtAc) çözgeni ilave edilerek Soxhlet cihazında 6 sa ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Etil asetat çözgeni kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası elde edilen kalıntı yapraklar etüvde tekrar kurutulmuş ve 25 g kalıntı üzerine 250 mL etanol (EtOH) çözgeni ilave edilerek Soxhlet cihazında 6 sa ekstraksiyon işlemine tabi tutularak süzümüştür (Tsimogiannis vd., 2017). Alınan ekstraktlardaki etil asetat ve etanol döner evaporatörde uçurularak son hacimleri etil asetat ve etanol ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Ekstraksiyon prosedürü akış şeması Şekil 1'de gösterilmiştir.

Toplam Fenolik Madde Tayini

Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri (TFMM) Folin-Ciocalteu fenol ayırıcı kullanılarak Singleton ve Rossi., (1965) tarafından tanımlanan Li vd. (2006) tarafından modifiye edilen metot ile belirlenmiştir (Li vd., 2006). Folin-Ciocalteu fenol ayırıcı (2 mL), örnek (0.4 mL) veya standart gallik asit çözeltileri (0.4 mL) ve % 7.5 Na₂CO₃ çözeltisi (1.6 mL) karıştırılıp, oda sıcaklığında 1 sa bekletildikten sonra 765 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüş ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek olarak hesaplanmıştır.



Şekil 1. Ekstraksiyon prosedürü akış şeması
Figure 1. Flow chart of extraction procedure

Toplam Flavonoid Tayini

Örneklerin toplam flavonoid miktar (TFM) analizi Zhinsen vd. (1999) metodu temel alınarak yapılmıştır (Zhishen vd., 1999). Saf su (4 mL) bulunan tüplere ekstrakt (1 mL) ve %5'lik NaNO₂ (0.3 mL) ilave edilerek 5 dk beklenmiştir. Bekleme sonunda %10'luk AlCl₃ (0.3 mL) eklenip 6. dk'da 1 M NaOH (1 mL) ile karıştırıldıktan sonra hacimler saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Pembe renkli bir karışım elde edilmiş ve absorbans değerleri 510 nm'de spektrofotometrede okunarak toplam flavonoid

miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar mg kateşin eşdeğeri (KE)/g örnek olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan Aktivite

DPPH ile Antioksidan Aktivite Analizi

Örneklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde DPPH radikali kullanılmıştır. Singh vd. (2002) tarafından geliştirilen, Çam vd. (2009) tarafından düzenlenen metot tercih edilmiştir (Çam vd., 2009). Metanol içerisinde çözüldürülen 0.1 mM DPPH (3.9 mL) tüplere aktararak üzerine ekstrakt (0.1 mL) eklenip 30 dk karanlık ortamda bekletilerek süre sonunda 517

nm dalga boyunda absorban değerleri okunmuştur. Örneklerin radikal süpürme aktiviteleri % olarak hesaplanıp, sonuçlar mg trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC)/g örnek olarak verilmiştir.

ABTS Metoduyla Antioksidan Aktivite Analizi

Örneklerin antioksidan aktivite tayini ABTS radikal katyonu kullanılarak Re vd. (1999) metoduna göre yapılmıştır (Re vd., 1999). ABTS⁺ stok çözeltisi hazırlanarak fosfat tamponu ile seyreltilip 734 nm dalga boyunda absorbanı 0.7'ye ayarlanmıştır, 2 mL hacimli küvetlere örnek (20-40-60-80 µL, kör çözelti için 20 µL tampon) ve ABTS⁺ (2 mL) eklenerek karanlık ortamda 6 dk bekletildikten sonra 734 nm'de absorbanlar okunmuştur. Örneklerin % inhibisyon değerleri hesaplanıp, mg trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC)/g örnek şeklinde ifade edilmiştir.

β-karoten Ağartma Testi ile Antioksidan Aktivite Analizi

Adaçayından alınan ekstraktların antioksidan aktivite (AA) analizi Singh vd. (2002) metoduna göre yapılmıştır (Singh vd., 2002). Sonuçlar % AA şeklinde belirtilmiştir. Metot uygulanırken ilk olarak β-karoten (0.2 mg), linoleik asit (20 mg) ve tween-40 emülgatörü (200 mg) kloroform (0.2 mL) içinde çözündürülüp, kloroform azot akımı altında uzaklaştırılarak hacmi 15 mL'ye oksijenli su ile tamamlanarak β-karoten emülsiyonu hazırlanmıştır. Kör çözelti hazırlamak için solüsyon aşamasındaki işlemler β-karoten olmadan saf su (0.2 mL) ile tekrarlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (Hd₁, Hd₂ 500 ve 1000 mg/l; EtAc₁, EtAc₂, 50 ve 200 mg/l; EtOH₁, EtOH₂ örnekleri ise 750 mg/l) ekstraktlar hazırlanmıştır. Kontrol çözeltisi için saf su (0.2 mL) ve örnekler için ekstraktlar (0.2 mL) tüplere alınarak üzerlerine β-karoten emülsiyonu (4 mL) eklenmiştir. 470 nm dalga boyunda kör çözeltiye karşı başlangıç absorban değerleri ölçülerek 50 °C'lik su banyosuna yerleştirilen örneklerin absorbanları her 10 dk'da bir okunmuştur. % AA değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$A\% = 100 \left[1 - \left(\frac{A_0 - A_t}{A_0^0 - A_t^0} \right) \right]$$

A₀: Örneğin başlangıç absorbanı

A_t: Örneğin 120 dk inkübasyon sonundaki absorbanı

A₀⁰: Kontrolün başlangıç absorbanı

A_t⁰: Kontrolün 120 dk inkübasyon sonundaki absorbanı

Alfa-Glukozidaz Aktivite Testi

Örneklerdeki fenolik maddelerin alfa-glukozidaz enzimi üzerine etkisi McDougall vd. (2005) tarafından oluşturulan enzimatik/spektroforometrik metoda göre belirlenmiştir (McDougall vd., 2005). Örneklerin enzimi inhibe etme durumları, enzimin aktivitesini % 50 oranında inhibe eden fenolik bileşik konsantrasyonu IC₅₀ şeklinde belirtilmiştir. pH'sı 6.8 olan 67 mM'lık KH₂PO₄ çözeltisi (Reaktif A), 3 mM'lık α-glukozidaz enziminin çalışmasını sağlayan glutathione çözeltisi (Reaktif B), 10 mM'lık substrat p-nitrofenil-α-D-glukozit çözeltisi (Reaktif C), 0.1 M'lık Na₂CO₃ çözeltisi (Reaktif D) ve toplamda 750 ünite α-glukozidaz enzimi bulunan standarttan 0.4 ünite hazırlanmıştır. Su banyosu 37 °C'ye ısıtılarak deney tüpleri su banyosuna yerleştirilmiştir. Tüplere örnek, kontrol ve kör numuneler olmak üzere çözeltiler sırasıyla eklenmiştir. 400 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbanlar okunmuş ve % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

İstatistik Analiz

SPSS (IBM, Statistics 22, New York, ABD) istatistik bilgisayar programı sonuçları analiz etmek amacıyla kullanılmış ve bağımsız iki örneklem t testi analizi ile iki grup arasındaki farklılıklar karşılaştırılarak, sonuçlar ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Adaçayı bitkisinden ilk olarak alınan ekstrakt, Clevenger düzeneği ile 1 ve 2 sa sürelerde distilasyon işlemi sonucunda elde edilen hidrosol (Hd) örneğidir. Retant kısmı süzülüp etüvde kurutulup öğütüldükten sonra Soxhlet cihazında sırası ile etil asetat ve etanol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Soxhlet cihazında etil asetat ile ilk alınan ekstrakt EtAc, etanol ile alınan ekstrakt EtOH olarak isimlendirilmiştir.

Adaçayından farklı çözen ve yöntemlerle elde edilen ekstraktların TFMM değerleri gallik asit

eşdeğeri (GAE), TFM değerleri kateşin eşdeğeri (KE) cinsinden Çizelge 1’de verilmiştir.

Çizelge 1. Ekstraktların Toplam Fenolik ve Flavonoid madde miktarları

Table 1. Total Phenolic and Flavonoid content of extracts

Örnekler* Samples*	TFMM(mg GAE/g örnek) TFMM(mg GAE/g samples)	TFM(mg KE/g örnek) TFM(mg CE/g samples)
Hd ₁	50.15 ^a ± 6.67	31.72 ^a ± 2.45
Hd ₂	60.63 ^a ± 8.49	40.23 ^a ± 8.16
EtAc ₁	18.41 ^a ± 2.08	32.83 ^a ± 2.89
EtAc ₂	16.71 ^a ± 1.67	30.69 ^a ± 3.36
EtOH ₁	1.27 ^a ± 0.19	1.11 ^a ± 0.23
EtOH ₂	1.19 ^a ± 0.82	1.18 ^a ± 0.48

*Hd₁, Hd₂: Clevenger cihazında su ile 1 ve 2 saat distilasyon işlemi sonrası elde edilen ekstraktlar; EtAc₁, EtAc₂:1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktı; EtOH₁, EtOH₂: 1ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktı.

TFMM: Toplam Fenolik Madde Miktarı, TFM: Toplam Flavonoid Miktarı, GAE: Gallik Asit Eşdeğeri, KE: Kateşin Eşdeğeri. Her ekstrakt grubu kendi içerisinde değerlendirilmiştir ve aynı sütun içerisindeki farklı harfler örnek ortalamaları arasında fark olduğunu belirtmektedir, P <0,05

*Hd₁, Hd₂: Extracts obtained after 1 and 2 hours of distillation with water in Clevenger apparatus; EtAc₁, EtAc₂:extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus; EtOH₁, EtOH₂: extracts of 1 and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus. TFMM: Total Amount of Phenolic Substance, TFM: Total Flavonoid Amount, GAE: Gallic Acid Equivalent, CE: Catechin Equivalent. Each extract group was evaluated in its own and different letters in the same column indicate a difference between the sample means, P <0.05

Ekstraktlar arasında toplam fenolik madde miktarı en fazla olan 2 sa hidrodistilasyona tabi tutulan Hd₂ (60.63 mg GAE/g) örneğidir. TFMM açısından Hd₂ örneğini sırasıyla Hd₁, EtAc₁, EtAc₂, EtOH₁ ve EtOH₂ örnekleri takip etmektedir. Bağımsız iki örneklem t testi sonucuna göre ekstrakt ortalamaları arasında önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir yani uygulanan ekstraksiyon süreleri materyaldeki toplam fenolik madde miktarı üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir. Literatürdeki mevcut çalışmalar incelendiğinde, çoğu çalışmada adaçayının kendisinin kullanıldığı görülmektedir. Etil asetat, metanol, etanol, su, dietil eter ve hekzanın çözen olarak kullanıldığı farklı çalışmalarda adaçayı toplam fenolik madde miktarı 10.06-64.98 µmol GAE/g (Koçak vd., 2016); 14.54-30.80 mg GAE/g (Başyigit ve Baydar, 2017); 33.83-114 mg GAE/g (Jeshvaghani vd., 2015); 4.27-161 mg GAE/g (Farhat vd.,2013); 4.25-5.95 mg GAE/g (Roby vd., 2013); 265.8-370.32 mg GAE/g (Martins vd., 2015); 3.03-126, 57-392 mg GAE/g (Erdogan vd., 2013) olarak belirlenmiştir. Literatür incelendiğinde kullanılan bitkisel materyale,

solvent tipine, ekstraksiyon metoduna, ekstraksiyon süresine, sıcaklığına ve birçok etkene bağlı olarak bitkilerin toplam fenolik madde miktarları geniş bir yayılım aralığı göstermektedir.

Toplam flavonoid miktarı incelendiğinde fenolik madde miktarı tayinindeki gibi en yüksek değer Hd₂ örneğinde gözlemlenmiştir. Hd₂ örneğini sırası ile EtAc₁, Hd₁, EtAc₂, EtOH₂ takip etmiş ve en düşük değer EtOH₁ örneğinde belirlenmiştir. Uygulanan işlem süreleri toplam flavonoid miktarını etkilemezken kullanılan solvent tipi ve işlem sırası miktar üzerinde oldukça etkili olmuştur. Farklı adaçayı türlerinin sırasıyla diklorometan, etil asetat ve etanol ile ekstraksiyona tabi tutulduğu çalışmada TFM etil asetatlı örneklerde 30.11-206.23 mg KE/g, etanollü örneklerde 8.29-108.78 mg KE/g aralığında belirlenmiştir (Erdogan vd., 2013). Çalışmamızda adaçayı yaprakları diklorometan yerine saf su kullanılarak, sırası ile etil asetat ve etanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Etil asetatlı örneklerde elde ettiğimiz değerler Erdoğan vd. (2013)’in bulduğu sonuçlar ile benzer aralıktadır. Mevcut çalışmalar incelendiğinde farklı

çözgen ve ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak adaçayı flavonoid içeriği 1343.48-3060.02 mg KE/100 g kuru madde (Yağcıoğlu, 2015); 6.99-7.54 g KE/100 g örnek (Zeković vd., 2017) aralıklarında belirlenmiştir. Yağcıoğlu (2015) farklı ekstraksiyon metotlarının adaçayının antioksidan kapasitesi üzerine yapmış olduğu çalışmada adaçayına uygulanan işlem süresi ve etanol miktarındaki artışın TFM azalmaya sebep olduğunu gözlemlemiştir (Yağcıoğlu, 2015). Bu

çalışmada, etanollü ekstraktların TFM düşük olmasının sebebi üçüncü kez ekstraksiyon yapılmasına, sulu ekstraksiyondan sonra tekrar ısıtma işlemi uygulanmasına ve çözgen olarak sadece etanol kullanılmasına bağlanabilir.

Ekstraktların antioksidan kapasiteleri DPPH ve ABTS testleri ile belirlenmiştir ve Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Ekstraktların TEAC değerleri
Table 2. TEAC values of extracts

Örnekler* Samples*	DPPH testi mg TEAC/g örnek mg TEAC/g samples	ABTS testi mg TEAC/g örnek mg TEAC/g samples
Hd ₁	71.96 ^a ± 4.06	77.37 ^a ± 1.84
Hd ₂	95.64 ^b ± 14.72	92.85 ^b ± 14.71
EtAc ₁	15.77 ^a ± 1.72	25.65 ^a ± 2.34
EtAc ₂	15.40 ^a ± 2.14	24.83 ^a ± 3.56
EtOH ₁	2.37 ^a ± 0.37	2.46 ^a ± 1.05
EtOH ₂	2.17 ^a ± 0.34	2.45 ^a ± 0.74

*Hd₁, Hd₂: Clevenger cihazında su ile 1 ve 2 saat distilasyon işlemi sonrası elde edilen ekstraktlar; EtAc₁, EtAc₂:1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktı; EtOH₁, EtOH₂: 1 ve 2 saat kalıntıların Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktı. TEAC: Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite, DPPH:2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Her ekstrakt grubu kendi içerisinde değerlendirilmiştir ve aynı sütun içerisindeki farklı harfler örnek ortalamaları arasında fark olduğunu belirtmektedir, P <0,05

*Hd₁, Hd₂: Extracts obtained after 1 and 2 hours of distillation with water in Clevenger apparatus; EtAc₁, EtAc₂:extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus; EtOH₁, EtOH₂: extracts of 1 and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus. TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid). Each extract group was evaluated in its own and different letters in the same column indicate a difference between the sample means, P <0.05

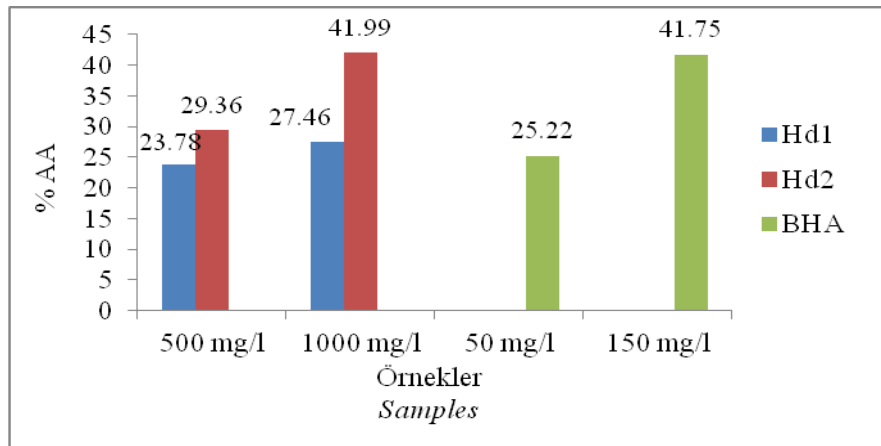
DPPH testi sonuçlarına göre Hd₂ ekstraktı en yüksek antioksidan aktiviteyi sergilerken en düşük değer EtOH₂ ekstraktında gözlemlenmiştir. Literatürde, adaçayı EC₅₀ (Radikali %50 indirgeyen etkin konsantrasyon) değeri, 3.37-77.07 µg TEAC/mL (Farhat vd., 2013); 181.0-198 µg/mL (Jeshvaghani vd., 2015); 11.47 µg TEAC/mL (Bayan ve Genç, 2016) ve 20.7-49.7 µg TEAC/mL (Tepe vd., 2006) aralıklarında belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda Koçak vd. (2016), adaçayı antioksidan aktivitesini DPPH testi ile gerçekleştirmiş ve değerlerini 5.93-54.71 µmol TEAC/g (Koçak vd., 2016); Yağcıoğlu, 439-509 mg TEAC/100 g kuru madde aralığında belirlemişlerdir (Yağcıoğlu, 2015). Yağcıoğlu tarafından yapılan çalışma ile, etanol

konsantrasyonunun artırılmasının antioksidan kapasite üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu bağlamda çalışmamızdan elde edilen EtOH’lı örneklerin antioksidan kapasitesinin düşük olması benzerlik göstermektedir. Etanollü ve etil asetatlı ekstraktlara Soxhlet cihazında 6 sa ısıtma işlemi uygulanması adaçayı bünyesinde bulunan antioksidan bileşiklerde degradasyona sebep olup antioksidan değerlerinde azalmaya sebep olabileceği göz önüne alınması değerlerin düşük olmasını açıklayabilir. Örnek değerleri incelendiğinde 1 sa ve 2 sa ekstraksiyon işlem sürelerinin EtAc ve EtOH’lı örneklerde herhangi bir farklılığa sebep olmadığı ifade edilebilir.

Ekstraktların ABTS testi sonuçları hesaplandığında en yüksek ABTS değerine Hd₂ örneğinin sahip olduğu görülmektedir. Hd₁ ve Hd₂ ekstraktlarının ABTS değerleri incelendiğinde ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0.05$). En yüksek TEAC değerine sahip örnek Hd₂ olmuştur. 2 sa distilasyon işleminin 1 saatlik işleme göre antioksidan özelliğe sahip bileşenlerin su formuna geçişinde daha etkili olduğu sonucu çıkarılabilmektedir. DPPH metodu ile antioksidan aktivite tayininde de paralel şekilde en yüksek antioksidan kapasite Hd₂, en az EtOH₂ örneğine aittir. Bir örneğin TEAC değeri ne kadar yüksek ise antioksidan kapasitesi de o kadar yüksektir. Bitkisel materyallerin antioksidan içeriği bünyelerinde bulundurdıkları fenolik maddelerin konsantrasyonu ile ilişkidir. Antioksidan etkiye sahip olan adaçayının yapısındaki en önemli fenolik bileşenler, karnosol, karnosik asit ve

rosmanoldür (Lu ve Yeap Foo, 2001). Genel olarak, DPPH yöntemi, daha yüksek stabiliteye (ve dolayısıyla daha düşük reaktiviteye) bağlı olarak ABTS yönteminden Trolox cinsinden daha düşük değerler sağlar (Marecek vd., 2017). Bu durumun, DPPH ve ABTS ile etkileşime giren fenoliklerin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Karotenoidlerin ootoksidasyon yoluyla renklerinde açılma meydana gelir. Bu renk açılması radikallere hidrojen atomu veren antioksidanlar tarafından engellenebilir ve bu amaç doğrultusunda en sık kullanılan antioksidan β -karotendir (Büyüktuncel, 2013). Örneklerin konsantrasyonu, TFMM baz alınarak, Hidrosoller 500 mg/l ve 1000 mg/l, asetatlı örnekler, 50 mg/l ve 200 mg/l, etanollü ekstraktlar 750 mg/l olacak şekilde hazırlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 2, 3 ve 4'te verilmiştir.



Şekil 2. Hidrosollerin 500 mg GAE/l ve 1000 mg GAE/l'de ki % AA değerleri

Figure 2. % AA values of hydrosols in 500 mg GAE/l and 1000 mg GAE/l

Hd₁, Hd₂: Clevenger cihazında su ile 1 ve 2 saat distilasyon işlemi sonrası elde edilen ekstraktlar, % AA: % Antioksidan Aktivite, BHA: Bütilhidroksianisol

Hd₁, Hd₂: Extracts obtained after 1 and 2 hours of distillation with water in Clevenger apparatus, % AA: % Antioxidant Activity, BHA: Butyatedlhydroxyanisol

500 mg GAE/l'de Hd₁ ile Hd₂, 1000 mg GAE/l'deki Hd₁'in % AA değerleri sentetik antioksidan olan BHA_{50 mg/l}'deki % AA değerine yakındır. % 41.99 değerlerine sahip olan 1000 mg GAE/l'deki Hd₂ ekstraktının % AA değeri BHA_{150 mg/l}'nin % AA değerine yakın bir sonuç vermiştir.

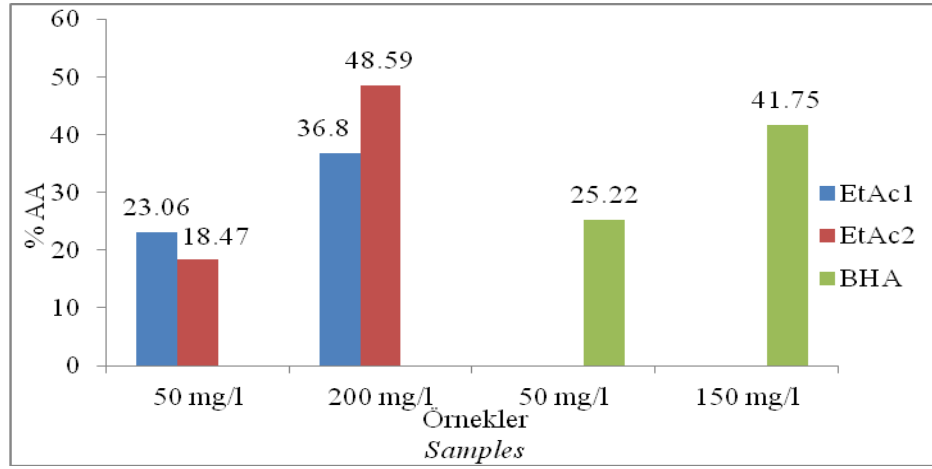
EtAc₁ ve EtAc₂ örneklerinin % AA değerleri Şekil 3'te verilmiştir.

50 mg GAE/l'de EtAc₁'in % AA değeri, sentetik antioksidanın BHA_{50 mg/l}'deki % AA değerine yakın bulunurken EtAc₂ örneğindeki düşük

bulunmuştur. BHA_{150mg/l}'nin % AA değeri ise 200 mg GAE/l'deki EtAc₁ ve EtAc₂ değerlerinin arasında bir değere sahip olduğu, 48.59 % AA kapasite ile en yüksek değere sahip örneğin 200 mg GAE/l'deki EtAc₂ örneği olduğu belirlenmiştir. 50 mg/l ve 200 mg/l konsantrasyonlar da hazırlanan etil asetat ekstraktlarının verileri ile BHA verileri ANOVA testi ile karşılaştırılmıştır. Uygulanan analiz sonucunda, 50 mg/l konsantrasyona sahip EtAc₁

ve BHA_{50mg/l} arasında önemli fark olmadığı belirlenmiştir. 200 mg/l konsantrasyonlu örnekler ve BHA % AA değerleri arasında anlamlı fark yoktur yani, adaçayı 200 mg/l konsantrasyonu yapay antioksidan olan BHA ile aynı antioksidan kapasiteye sahiptir.

Etanollü ekstraktların % AA değerleri Şekil 4'te verilmiştir.

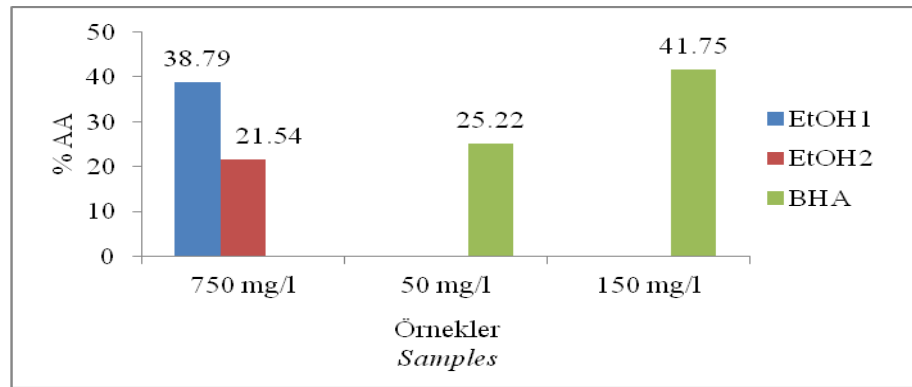


Şekil 3. Etil asetatlı ekstraktların 50 mg GAE/l ve 200 mg GAE/l'de ki % AA değerleri

Figure 3. % AA values of ethyl acetate extracts in 50 mg GAE/l and 200 mg GAE/l

EtAc₁, EtAc₂: 1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktları, %AA: % Antioksidan Aktivite, BHA: Bütilhidroksianisol

EtAc₁, EtAc₂: Extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus, % AA: % Antioxidant Activity, BHA: Butylatedhydroxyanisole



Şekil 4. Etanollü ekstraktların 750 mg GAE/l'de ki % AA değerleri

Figure 4. % AA values of ethanol extracts in 750 mg GAE/l

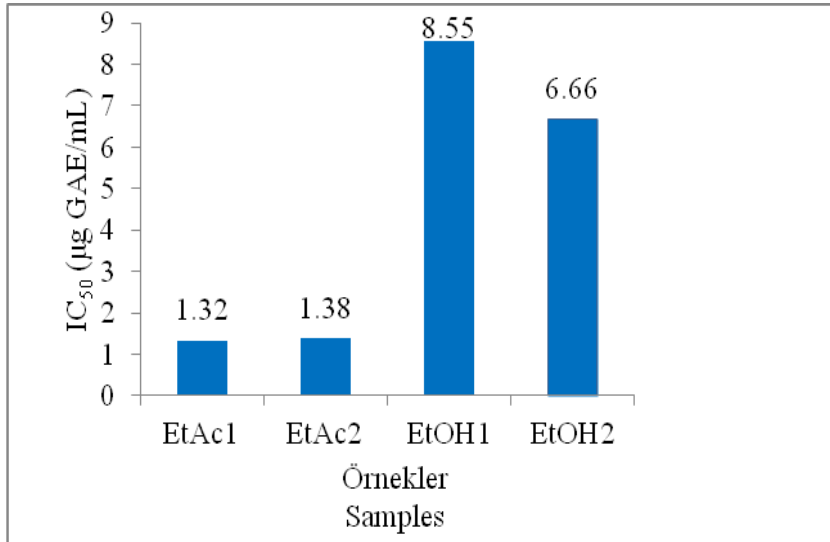
EtOH₁, EtOH₂: 1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktları, %AA: % Antioksidan Aktivite, BHA: Bütilhidroksianisol

EtOH₁, EtOH₂: Extracts of 1 and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus. % AA: % Antioxidant Activity, BHA: Butylatedhydroxyanisole

Ekstraktların % AA değerleri ile BHA'nın % AA değerleri karşılaştırıldığında 750 mg GAE/l'deki EtOH₁ değerinin BHA_{150 mg/l} değerine, EtOH₂'nin BHA_{50 mg/l}'deki % AA değerine yakın olduğu belirlenmiştir. Kelen vd. (2008) farklı adaçayı türleri üzerine yaptıkları çalışmada % AA değerlerini 81.1-92.4 aralığında bulurken, BHT % AA değerini 96.6 olarak (Kelen ve Tepe, 2008); Tepe yürüttüğü bir çalışmada (2008), adaçayı türlerinin % AA değerlerini 54.42-77.03 aralığında, BHT'nin % AA değerini ise 96.00 olarak belirlerken (Tepe, 2008) diğer çalışmasında adaçayı % AA değerini 29.02-69.2 aralığında, BHT % AA değerini 96 olarak belirlemiştir (Tepe vd., 2006). Farklı konsantrasyonlarda ve farklı çözücüler ile elde edilen adaçayı ekstraktlarında β-

karoten ağarma testi sonucu elde edilen sonuçlar Tepe'nin (2006) sonuçları ile karşılaştırıldığında, sentetik antioksidanların % AA değerleri ve adaçayı atığı ekstraktlarının % AA değerinin benzer olduğu söylenebilir.

Su, etil asetat ve etanol kullanılarak elde edilen adaçayı ekstraktlarının α-glukozidaz inhibisyon aktivitesi tayin edilmiş ve sonuçlar IC₅₀ olarak ifade edilmiştir. IC₅₀ değeri ne kadar düşüğe mevcut fenolik bileşiğin etkinliği o kadar yüksektir. IC₅₀ değeri enzim aktivitesini % 50 oranında inhibe eden örnek konsantrasyonu olarak tanımlanmaktadır. Ekstraktların IC₅₀ değerleri Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5. Örneklerin toplam fenolik madde miktarına göre IC₅₀ (µg GAE/mL) değerleri

Figure 5. IC₅₀ (µg GAE/mL) values of samples according to total phenolic content

IC₅₀:Enzim aktivitesini %50 inhibe eden fenolik madde miktarı (µg GAE/mL), GAE: Gallik Asit Eşdeğeri, EtAc₁, EtAc₂:1 ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etil asetat ile elde edilen ekstraktı, EtOH₁, EtOH₂: 1ve 2 saat kalıntılarının Soxhlet cihazında etanol ile elde edilen ekstraktı

IC₅₀ is the concentration of phenolics required to inhibit 50% of the enzyme activity (µg GAE/mL), GAE: Gallic Acid Equivalent, EtAc₁, EtAc₂:Extracts of 1 and 2 hours residues obtained with ethyl acetate in Soxhlet apparatus; EtOH₁, EtOH₂: extracts of 1and 2 hour residues from ethanol obtained in Soxhlet apparatus

α-glukozidaz enzimini inhibe etmek için gerekli olan en yüksek konsantrasyonun 8.55 µg GAE/mL değeriyle EtOH₁ örneğine ait olduğu bulunmuştur. En düşük konsantrasyonun EtAc₁ örneğine ait olduğu belirlenmiştir. Bahadori, adaçayı metanollü ekstraktının α-glukozidaz enzimini % 50 inhibe etmek için gerekli olan

konsantrasyonunu 18.9 µg GAE/mL (Bahadori vd., 2015); Şen Arslan 0.14 mg GAE/mL (Şen Arslan, 2017); Kalaycıoğlu, 17.6 ile 173 µg/mL olarak belirlemişlerdir (Kalaycıoğlu vd., 2018). IC₅₀ değeri küçüldükçe antidiyabetik aktivite artmaktadır. Sonuçlar arasında en düşük IC₅₀ değeri EtAc₁ örneğine aittir. Örneklerin toplam

fenolik madde miktarları dikkate alındığında en yüksek TFMM EtAc₁ örneğindedir yani TFMM arttıkça antidiyabetik aktivite artmaktadır.

SONUÇ

Yürütülen bu çalışmada adaçayı uçucu yağları alındıktan sonra geriye kalan atık kısmın biyoaktif potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda adaçayı yaprakları 1 ve 2 saatlik distilasyona tabi tutulup daha sonra distilasyon kalıntısı yapraklara tekrar sırası ile etil asetat ve etanolün çözgen olarak kullanıldığı ikinci ve üçüncü ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı, antioksidan ve α -glukozidaz aktiviteleri incelenmiştir. 2 sa distilasyona tabi tutulan ekstraktların fenolik madde, flavonoid madde ve antioksidan kapasite değerlerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Alfa glukozidaz inhibisyon aktivitesi yönünden, IC₅₀ değeri en düşük olan etil asetat 1 sa (EtAc₁) ekstraktının en az konsantrasyonla α -glukozidaz enzimini inhibe ettiği sonucu çıkarılmıştır. Bitkisel materyallerin β -karoten ağartma testine göre antioksidan aktivite değerleri en yüksek olan ekstrakt EtAc₂ olup onu Hd₂ ekstraktının takip ettiği belirlenmiştir. Ekstraksiyon yönteminin, kullanılan çözgen ve işlem sırasının materyalin biyoaktif potansiyeli üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Adaçayı bitkisi ve kullanılan yöntemler ile sınırlı kalınmayarak klasik yöntem, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemleri, diğer tıbbi ve aromatik bitkilerin biyoaktif potansiyelinin belirlenmesi amacı doğrultusunda yeni çalışmalarda kullanılabilir.

KAYNAKÇA

Bahadori, M. B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Farimani, M. M., Bahadori, S. (2015). Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *J Funct Foods*, 18: 727-736.

Başıyigit, M., Baydar, H. (2017). Effects of different harvesting time on essential oil, phenolic compounds and antioxidant activity in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Süleyman Demirel Univ J Natural and Applied Sci*, 21, 131-137.

Bayan, Y., Genç, N. (2016). Determination of antioxidant capacity and total phenolic matter of *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca*. *Neşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(2), 158-166.

Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkilerin üretiminin artırılması olanakları. *Türkiye Ziraat Mübendisliği VII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-I*, 437: 11-15.

Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharm J*, 17(2): 93-103.

Çam, M., Hışıl, Y., Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chem*, 112: 721-726.

Emir Çoban, Ö., Patır, B. (2010). Use of some spices and herbs antioxidant affected in foods. *Electronic J Food Techno*, 5(2): 7-19.

Erdogan, I., Sezer, F., Ercetin, T., Kahraman, A., Celep, F., Akaydin, G., Sener, B., Dogan, M. (2013). Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Ind Crops & Prod*, 41: 21-30.

Farhat, M., Landoulsi, A., Chaouch-hamada, R., Sotomayor, J. A., Jordán, M. J. (2013). Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. *Ind Crops & Prod*, 49: 904-914.

Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M. S. (2011). History of the use of medical and aromatic plants and their economic importance. *Kastamonu Univ J For Fac*, 11(1): 52-67.

Jeshvaghani, Z., Rahimmalek, M., Talebi, M. (2015). Comparison of total phenolic content and antioxidant activity in different *Salvia* species using three model systems. *Ind Crops & Prod*, 77: 409-414.

Kalaycıoğlu, Z., Uzaşçı, S., Dirmenci, T., Erim, F. B. (2018). Alpha-Glucosidase enzyme inhibitory effects and ursolic and oleanolic acid contents of

- fourteen Anatolian *Salvia* species. *J Pharm Biomed Anal*, 155: 284-287.
- Kelen, M., Tepe, B. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresour Technol*, 99: 4096-4104.
- Koçak, M. S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M., Tepe, B. (2016). *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Ind Crops & Prod*, 85: 204-212.
- Li, Y., Guo, C., 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: 254-260.
- Lu, Y., Yeap Foo, L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem*, 75(2): 197-202.
- Marecek, V., Hampel, D., Cejka, P., Neuwirthov, J., Malachov, A., Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *J Cereal Sci*, 73: 40-45.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chem*, 170: 378-385.
- McDougall, G., Shpıro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. (2005). Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-Amylase and alpha-Glucosidase. *J Agric Food Chem*, 53: 2760-2766.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggenete, A., Pannala, A., Yang, M., Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26(98): 1231-1237.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind Crops and Prod*, 43: 827-831.
- Şen Arslan, H. (2017). Bazı tıbbi aromatik bitki ekstraktlarının fenolik madde içerikleriyle amilaz, glukozidaz ve lipaz enzimleri üzerine etkileri. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Türkiye, 92 s.
- Şenkal, B. C., İpek, A., Cesur, C., Doğan, H. (2016). Yozgat florasına kayıtlı adaçayı (*Salvia*) aksonlarının bitkisel özellikleri ve tıbbi önemi. *I.Uluslararası Bozok Sempozyumu Bildiri Kitabı*, 4: 84-96.
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K., Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Food Chem*, 50: 81-86.
- Tepe, B. (2008). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresour Technol*, 99: 1584-1588.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem*, 95: 200-204.
- Torun, M., Topuz, A., Akdoğan, A., Şahin, H., Feramuz, Ö. (2008). Çözünür (İnstant) dağ çayı (*Sideritis stricta*) üretiminde ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Türkiye 10. Gıda Kongresi Bildiriler Kitabı*, 37: 183-186.
- Tsimogiannis, D., Choulitoudi, E., Bimpilas, A., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y., Oreopoulou, V. (2017). Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by-products. *J Appl Res Med Aromat Plants*, 4: 12-20.
- Yağcıoğlu, P. (2015). Farklı ekstraksiyon metodları ile adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, Türkiye, 121 s.

Zeković, Z., Pintać, D., Majkić, T., Vidović, S., Mimica-Dukić, N., Teslić, N., Versari, A., Pavlić, B. (2017). Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery-Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Ind Crops and Prod*, 99: 49-59.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in Mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*, 64: 555-559.



**DETERMINATION OF TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS AND
ANTIOXIDANT CAPACITY OF ANZER HONEY PRODUCED IN RIZE,
TURKEY**

Fatma Hepsağ*

Korkut Ata University, School of Applied Sciences, Department of Food Technology, Kadirli Campus,
Osmaniye, Turkey

Received / Geliş: 21.02.2019; Accepted / Kabul: 24.06.2019; Published online / Online baskı: 19.07.2019

Hepsağ, F.. (2019). *Determination of total phenolic compounds and antioxidant capacity of Anzer honey produced from endemic flowers of Anzer Plateau in Rize, Turkey. GIDA (2019) 44 (4): 641-653 doi: 10.15237/gida.GD19046*

Hepsağ, F.. (2019). Rize'deki Anzer Yaylası'nın endemik çiçeklerinden üretilen Anzer balının toplam fenolik bileşiklerinin ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi. GIDA (2019) 44 (4): 641-653 doi: 10.15237/gida.GD19046

ABSTRACT

The purposes of this study is to determine the physico-chemical and bioactive properties of Anzer honey, which is produced in widespread of Anzer plateau in Rize. Mineral contents of samples were determined by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES). The most abundant minerals were potassium, calcium, sodium, and magnesium, ranging between 1265.87 - 5887.65, 299.56 - 854.36, 289.41 - 591.45, and 41.54 - 90.54 mg/kg, respectively. In addition, this study shows that the color of Anzer honey is quite different and it is usually light yellow and some of it is dark brown. The total phenolic content of the samples (TPC) was found between 802.6- 1352.6 µg GAE / g honey. Total antioxidant contents (TAC) were determined between 9.12-20.69 µmol TE / g. TAC of honey samples clearly shows that it contributes to TPC and sweeping activity.

Keywords: Anzer, ICP-OES, DPPH, TAC, TPC.

**RİZE'DEKİ ANZER YAYLASI'NIN ENDEMİK ÇİÇEKLERİNDEN ÜRETİLEN
ANZER BALININ TOPLAM FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE ANTİOKSİDAN
KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Rize'deki Anzer yaylasında yaygın olarak üretilen Anzer balının fiziko-kimyasal ve biyoaktif özelliklerini belirlemektir. Numunelerin mineral içerikleri, İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektrometresi (ICP-OES) ile belirlenmiştir. En fazla bulunan mineraller sırasıyla 1265.87 - 5887.65, 299.56 - 854.36, 289.41 - 591.45 ve 41.54 - 90.54 mg/kg arasında değişen potasyum, kalsiyum, sodyum ve magnezyumdur. Ayrıca, bu çalışma Anzer balı renginin oldukça farklı olduğunu ve genellikle açık sarı ve bazılarının koyu kahverengi olduğunu göstermektedir. Numunelerin toplam fenolik madde miktarı (TPC) 802.6- 1352.6 µg GAE/g bal arasında bulunmuştur. Toplam antioksidan içerikleri de (TAC) 9.12-20.69 µmol TE/g arasında tespit edilmiştir. Bal örneklerinin yüksek antioksidan kapasitesi, fenolik bileşiklere (TPC) ve süpürme aktivitesine katkıda bulunduğunu açıkça göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Anzer, ICP-OES, DPPH, TAC, TPC.

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ fatmahepsag@osmaniye.edu.tr

☎ (+90) 328 888 0090

☎ (+90) 328 888 0091

INTRODUCTION

Honey is a natural sweet substance that is secreted by honeybees and released into the nature of the plants' nectar or released into the secretions of some of the insects that some of them feed on live parts (Codex Alimentarius Commission Standards, 2001). Honey is generally composed of carbohydrates, nitrogenous compounds such as amino acids, organic acids, minerals, pigments, flavoring substances, vitamins, waxy substances, pollen grains and water. These compounds are parameters affecting honey viscosity, hygroscopicity, crystallization, color, flavor, density and shelf life (Ajlouni and Sujirapinyokul, 2010). Honey also contains many other substances such as Maillard reaction products, volatile compounds and bioactive substances that affect the sensory and physical traits of honey as well as biological potential. It is a complex, concentrated aqueous sugar solution that plays a crucial role in this composition, including its geographical origin, climate, botanical source, processing and storage conditions (Manzanares et al., 2011). In addition, honey is known for its natural antioxidant source and antimicrobial properties. The antioxidant capacity of honey is widely used to determine the radical sweeping ability by the widely used DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. The ability of the honey material to sweep the radical properties was found to be related to the total phenolic substance myrites. Components that enhance the antioxidant traits of honey, including catalase, ascorbic acid, peroxidase, carnaenoids, flavanoids, amino acids, phenolic substances, Maillard reaction products and others. It is important to note that in honey composition there is very little glucose and sucrose as sugars (Ajlouni and Sujirapinyokul, 2010).

Hydroxy methyl furfural (HMF) is naturally produced by heat treatment in fresh products, because HMF is a sign of heat-treated honey. The long-term heating of honey causes enzyme loss and fructose breakdown to form HMF. Heating honey for a long time at high temperature or storing it in bad conditions for a long period of time causes to decrease of nutrient contents and to increase amount of HMF. For this reason,

increasing HMF amount is undesirable in honey. For example, HMF in fresh honey should be less than 15 mg/kg. The European Union has an HMF limit of 40 mg (Codex Alimentarius Commission Standards, 2001).

In recent years, the antibiotic properties of honey is used in cancer cases, diminished immune system, heart diseases, eye diseases such as cataracts, various injuries, and healing of inflammatory cells (Anonymous, 2002). Turkey has geographically and climatic conditions to provide a favorable environment for the development of beekeeping and honey production. Recently, a number of studies have been published related to different geographical and botanical origins of honey, physical and chemical characteristics and to determine the quality of honey. However, there is no publication on the physicochemical properties and in determining antioxidant activities of Anzer honey, which is known to be legendary and good for many diseases. The main aim of this study is to contribute to the knowledge of eastern black sea Anzer honey with different floras of eastern black sea by analyzing physicochemical properties.

MATERIALS AND METHODS

Honey samples

Anzer honey samples (~ 1000 g) were collected from the beekeepers in the Eastern Black Sea Region, Anzer Plateau Rize (altitude 40° 35' 21"N, longitude 40° 31' 0" E, altitude 2200 m). Samples were obtained in November. The quality criteria in the honey samples were analyzed in the Food Technology Department of the School of Applied Sciences Korkut Ata University and at the Ministry of Food, Agriculture and Livestock laboratories. Honey samples placed in sterilized glass containers and stored at 3°C then were analyzed within 48-36 hours after harvest. pH, moisture, total acidity, fructose, glucose, sucrose, ash, potassium, calcium, magnesium, sodium, HMF, diastase enzyme, electrical conductivity, color, TPC, TAC were investigated in honey samples. Analyzes were performed in triplicate and the methods applied were described below.

Physicochemical properties

For the determination of pH value, the probe of the pH-meter (HANNA HI 2211-02, Romania) was dipped into the honey solution prepared with distilled water (10% w/v) (Bogdanov and Edder, 2004). The refractometric method was used to measure the moisture content of honey (the honey-soluble solid which is defined by the International Honey Commission). For this purpose, the fracture index at 20°C was read using an Abbott-type refractometer (Bausch and Lomb, USA) (Anonymous, 2006c). The acidity value of the honey was determined by three-stage titration (free, lactic and total acidity value). The pH solution was added to a solution of 0.5 M NaOH that had been spun to pH 8.50. The amount of consumed hydrochloric acid solution (mL) was then recorded for titration while lowering to pH 8.30 with 0.5 M Hydrochloric acid solution. The result was calculated as meq/kg with the aid of the following equation (Bogdanov et al., 1997). Fructose, glucose and sucrose content of the major sugars contained in honey were determined by HPLC method (Anonymous, 1997). The HPLC conditions are as follows: HPLC: AGILENT 1100A, Detector: Refractive Index (RID, 1100A), Column: 250x4.6 mm ID, amine modified silica gel having a particle diameter of 5-7 µm (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG., Germany), Mobile phase: Acetonitrile: Water (4:1), Column and detector temperature: 30°C, Pump flow rate: 1.3 mL/min, Injection volume: 10 µL. 2.5 g of honey was dissolved in a 50 mL balloon flask with some water. 12.5 mL of methanol was added and 50 mL of pure water was added. The solution was filtered through a 0.45 µm membrane and then injected into HPLC. Honey quantities were calculated by comparing the peak times and peak times of the sugars in the standard solution (Anonymous, 1997). For ash analysis approximately 2.5 g of honey is weighed and is placed on a heater until the moisture fully evaporated, and then when the sample rich a certain weight placed in an ash furnace set at 600°C. The total amount of ash was calculated as percentage by weight (Anonymous, 2006b). Analysis of mineral elements (K, Ca, Na, Mg) VARIAN brand, OPTIMA 2100 model ICP-OES system was used for the analysis conditions

were followed (Anonymous, 1998). Power: 1,00 kW, Pump speed: 15 rpm, Plasma flow: 15 L/min, Auxiliary flow: 1.5 L/min, Nebulizer flow: 0.90 L/min. The absorbance values of the elements were measured at the following wave lengths: Potassium 405.7 nm, Calcium 397.8 nm, Sodium 589.9 nm, Magnesium 280.2 nm. 0.5 grams of honey was weighed into high pressure resistant teflon containers, 7.5 mL of 65% nitric acid was added, the mouths of the containers were tightly closed and the MARS HP500 PLUS VESSELS CEM model heat and a pressure-controlled microwave combustion unit. The HPLC method was used for HMF determination (Anonymous, 2002a). The analysis conditions by HPLC were as follows: HPLC: Aggilent 1100A, Detector: DAD (1100A), Column: 250x4.6 mm C18 column (Macherey GmbH & Co. Germany), Mobile phase: Methanol: Water (10:90), Column and detector temperature: 30°C, Pump flow rate: 1 mL/min, Injection volume: 20 µL, Wave Length: 285 nm. For analysis of honey sample, 5 g honey sample was weighed in a 100 mL balloon jug with 0.01 precision. Distillate was dissolved with water and completed to the balloon line. The solution was filtered through a 0.45 µm membrane and then injected into the HPLC system. The amount of HMF in the honey was calculated as mg/kg using peak area and standard curve. For determination of diastase, approximately 10 g of honey was dissolved in 40 to 50 mL of distilled water in a beaker. The mixture was taken into a 100 mL beaker and diluted with distilled water to the marking line. Solvents used to prepare the buffer solution to be used in the analysis are: Citric acid monohydrate solvent: 21.01 g citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) is dissolved in about 500 mL of water in a 1000 mL measuring flask and dissolved in distilled water to 1000 mL. Disodium hydrogen phosphate dehydrate solvent: 35.60 g of disodium hydrogen phosphate dehydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) was dissolved in about 500 mL of water in a 1000 mL measuring flask and dissolved in distilled water to 1000 mL. Preparation of phosphate / citrate buffer: Citric acid monohydrate solution 469 mL was placed in a 2 L volumetric flask and mixed with 531 mL of the disodium hydrogen phosphate dehydrate solution. The beaker was placed on a magnetic

stirrer and the electrode was immersed in the solution after calibration of the pH meter was performed. The pH of the mixture was adjusted to pH 5.2 by titration with 0.5 N hydrochloric acid solution if the pH of the mixture was 5.2 and pH 5.2 with 0.5 N sodium hydroxide solution. Starch solution: 1 g starch is weighed into a 100 mL balloon jug and mixed with some distilled water were mixed and boiled. Once complete dissolution was achieved, it was cooled down to the marking line (Anonymous, 2002). The analysis of the determination of the electrical conductivity, which is defined as the ability of the honey to transmit electricity, is mainly based on the measurement of the electrical resistance. The instrument was calibrated with special calibration solutions. Calibration solutions used for this purpose are 0.05 % NaCl, 0.05 % KCl, 1 % NaCl, 1% KCl solutions. For measurement of the electrical conductivity of the sample, 10 g of honey was weighed in a 50 mL beaker. After dissolving with some distilled water, the balloon was taken out and 50 mL was added. About 20 mL of this solution was taken and the temperature was adjusted to 20°C and measured with a conductor meter (RADIOMETER brand, CDM 80 model). The result is given in ms/cm (Anonymous, 2002b). The color of the honey samples was measured using a Minolta colorimeter CM-2600d instrument with L*(100: white, 0: black), a* (+: red, - green) and b* (+: yellow, -: blue). The instrument was calibrated using a white tile (L* =92.48, a* = -0.24 and b* = 1.01) as standard. The results were expressed in accordance with the CIELAB system with reference to illuminant D65 and with a visual angle of 10° (Anupama et al., 2002).

Bioactive properties

The phenolic compounds, which are the basis of the total phenolic assay, are based on the redox reaction in which the Folin-Ciocalteu reagent is reduced in the basic medium and converted to its oxidized form. By measuring the absorbance of the blue color formed by the reduced reagent in the reaction result, it is possible to calculate the total amounts of the phenolic compounds to be analyzed. The color intensity of the resulting complex is directly proportional to the

concentration of the phenolic materials. 2 g of honey sample was diluted with 40 mL of pure water, filtered by Whatman filter (4 times folded). Then added 1 mL of this solution, 2.5 mL of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent and 2 mL of 0.7 M sodium carbonate (Na₂CO₃), then stirred for 6 minutes. It was allowed to stand in the dark for 2 hours at 25 °C. After reaction, absorbance values were read at 740 nm. The total phenolic material was expressed as gallic acid equivalents (GAE) per gram of honey (Singleton and Rossi, 1965).

The antioxidant properties of honey samples were determined by the DPPH method (Socha et al., 2009). 25 g of honey were dissolved in 50.0 mL of purified water and 1 mL of this solution was added to 29 mL of DPPH solution (1: 100 methyl alcohol 80 % v / v). The sample solution and a DPPH control solution were left in the dark for 30 minutes at 25°C. The absorbance of the sample solution and a DPPH control solution was measured at 515 nm with a UV-Vis spectrophotometer (OPTIMA brand SP-3000 NANO, Japan).

Statistical analyses

Statistical analysis of the samples was performed using the SPSS 16.0 statistical program analysis (ANOVA). The differences between the samples were compared using Duncan multiple comparison tests.

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical properties

Honey is a natural product with low pH and is not suitable for the growth of microorganisms. The pH refers to the presence of hydrogen ions in honey. In addition, the presence of hydrogen ions in honey is an effective parameter on texturing, composition and shelf life, which is a useful variable to estimate the quality of the product (Bogdanov et al., 1997). The pH values of the honey samples ranged from 3.74 to 4.08 (Table 1). Average the lowest pH value was found in sample 3, and the highest average value was found in sample 1 of honey. In a study on nectar, secretory and mixed honey samples in Spain, the pH value was determined between 3.29 and 4.88 (Sanz et al., 2005). In another study conducted in Algeria

and Spain, the pH value was between 3.50 and 4.58 (Rashed and Soltan, 2004). (Yılmaz and Küfrevioğlu, 2001) found that the average pH value of honey samples collected from Eastern and Southeastern Anatolia regions is 3.8. Turkish Food Codex Regulation no limit for pH is specified in Honey Communiqué, it is stated that the pH of honey should be between 3.4 and 6.1 in Turkish Standards Institute Honey Standard. The pH values found in this study are similar to other

studies. In general, a low pH of honey is not suitable for the growth of microorganisms. Honey acidity is responsible for the aroma and stability against microbial deterioration. It has also been observed that honey has played an important role in the healing of the wound when it has been applied to the wound area for years. Because injuries do not heal easily usually have an alkaline environment and healing is easier in an acid environment (Gethin et al., 2008).

Table 1. Physico-chemical parameters of analyzed Anzer honey samples.

Honey samples	Moisture %	Ash %	Electrical conductivity (EC) mS/cm	pH	Total acidity (meq/kg)	HMF mg/kg	Diastase	Fructose	Glucose	Sucrose
AH1	21	0.6	0.26	4.08	9.98	1.82	38.41	30.52	18.12	0
AH2	19	0.59	0.39	3.78	15.56	3.45	36.81	31.52	17.52	0
AH3	16	0.61	0.43	3.74	9.74	4.56	35.14	32.65	17.23	0
AH4	17	0.65	0.49	3.85	17.95	5.41	35.67	33.36	19.47	0
AH5	17	0.67	0.36	4.01	21.65	3.12	36.82	33.65	20.41	0
AH6	19	0.68	0.38	4.07	25.65	2.34	37.98	32.52	21.42	0
AH7	16	0.61	0.67	3.89	9.65	5.86	34.92	36.52	34.65	0
AH8	16	0.66	0.76	3.99	14.32	6.11	33.21	38.65	34.41	0
AH9	17	0.74	0.72	3.94	13.12	12.15	21.45	40.98	36.47	0
AH10	17	0.64	0.59	4.01	15.74	11.56	23.65	32.41	25.41	0
AH11	16	0.66	0.68	4.05	14.54	8.87	31.85	34.52	28.47	0
AH12	17	0.65	0.74	4.04	19.87	7.16	34.14	35.61	33.54	0
AH13	16	0.62	0.44	4.01	18.97	9.65	29.14	30.54	21.74	0
AH14	18	0.65	0.68	3.96	21.65	8.45	29.54	31.14	22.74	0
AH15	19	0.71	0.45	4.07	25.64	3.65	37.47	31.41	23.78	0
AH16	15	0.74	0.69	3.78	27.96	10.65	19.45	30.65	19.41	0
AH17	17	0.75	0.52	3.79	20.32	12.32	20.47	30.41	18.75	0
AH18	18	0.78	0.56	3.99	12.65	17.8	9.45	31.54	19.56	0
AH19	16	0.68	0.69	3.98	11.21	15.63	10.52	30.74	22.63	0
AH20	14	0.62	0.78	4.06	17.68	15.54	9.42	39.54	24.23	0
AH21	16	0.67	0.79	3.89	16.31	8.62	28.74	40.74	33.87	0
Mean	17	0.67	0.57	3.95	17.15	8.32	28.3	33.79	24.47	0
SD	3.54	0.05	0.16	0.11	5.37	4.64	9.69	3.52	6.41	0
Min	14	0.59	0.26	3.74	9.65	1.82	9.42	30.41	17.23	0
Max	21	0.78	0.79	4.08	27.96	17.8	38.41	40.98	36.47	0

On honey moisture content, flower source, climate factors, honey harvest time, honey maturity grade, bee species play an important role. Water affects the viscosity, specific weight,

maturation, crystallization, taste, preservation, shelf life and taste of honey in the content. Moisture analysis is carried out to determine the product safety at the end of the storage period to

the last point reached by the honey from acceptance of honey. It is also an important quality criterion for the possibility of fermentation of the product. Fermentation does not start when the sugars, which provide the typical sweetness and usefulness of honey, are as high in concentration as possible. When the water content is 18.5% and higher fermentation can occur. The moisture shows that the honey does not mature, or that there is water from the outside. This, in turn, promotes the development of honey, osmophilic microorganisms, resulting in the danger of surface fermentation. In addition, it affects the sensory and nutritional properties of honey in a negative way and reduces the product shelf life. The moisture content (%) in honey samples examined ranged between 14-21%. All other samples, except the AH1 honey sample (21%), have a maximum moisture content of less than 20% recommended for the International Honey Commission (Acquarone et al., 2007). One of the important quality criteria of honey is the degree of acidity. The main factors determining the acidity of honey are organic acids and minerals as well as amino acids, peptides and carbohydrates. The total acidity of the honey is 9.65 to 27.96 meq/kg (%) in the twenty-one case of honey. (Al-Doghairi et al., 2007) found a total acidity range of 9.12-93.02 meq/kg for the Saudi honey. The amount of free acid should not exceed 50 meq per 1000 g of water according to the Turkish Food Codex (TGC), Codex Alimentarius Standard Honey Commission (CAC) and European Union (EU) standards. Batu et al., (2013) reported total acidity values of 6.73-47.06 meq/kg. Velioğlu and Köse, (1983) determined the total amount of acidity in sunflower honey as 14.35 meq/kg on average. Thus, the analyzed samples are in accordance with the standards and similar to the studies done. In twenty-one Anzer honey samples, the percentages of fructose and glucose ranged from 30.41% to 40.98% and from 17.23% to 36.47%, respectively. The twenty-one studied the dominant sugar, fructose and then glucose. The high amount of sucrose in honey indicates that honey is harvested early and that sucrose is not sufficiently reduced, that the bees are fed with sucrose or that direct sucrose is added to honey (Ayдын et al., 2008). No sucrose was

observed in all samples. Because in Anzer's production, the bee is never given sugar. As can be seen in the sugar composition, Anzer is a proof that honey does not contain table sugar (sucrose). The maximum limit for honey samples by the European Community of sucrose is 5% (Anonymous, 2001). In addition, the fructose / glucose ratio for honey is important, and it tells us that honey is liquid when the crystallinity of honey is higher than that of glucose (Feás et al., 2010). All of the Anzer honey samples examined were in liquid state. Ash content can be used to determine the botanical origin (floral, mix or honeydew) (White et al., 1963). In the samples, the content of ash was between 0.59% and 0.78%, and the results are within the limits given for flower honey (0.6%). The minerals found in the soil can first be transferred to the plant matter and then to the honey component together with the nectar (Gul, 2008). Mineral content is one of the parameters used to evaluate nutritional values of honey. It can be thought of as a potential indicator of the geographical origins of honey and as an important biomarker for the environmental pollution of heavy metals. This analysis is important for beekeepers and consumers because it helps avoid potential contamination during processing and ensures that the product is of good quality. The concentration of mineral components in the honey varies between 0.1% and 1.0%. When compared with nectar honey, the rate of mineral matter is higher due to their high electrical conductivity (Lachman et al., 2007). The most common macro element in the honey samples taken from the Rize province in the Eastern Black Sea region was potassium (K) and the other macro elements were calcium (Ca), sodium (Na) and magnesium (Mg) and apart from these, the other elements in the honey are in the group of micro elements. Generally, the most abundant elements found in the investigated honey samples were potassium, calcium sodium, and magnesium which ranged between 1265.87 and 5887.65, 299.56 and 854.36, 289.41 and 591.45, and 41.54 and 90.54 mg/kg honey, respectively. Variability in the individual amounts of minerals in analyzed honey samples can be attributed to differences in flower type and soil composition (table 2) (Solayman, et al., 2016).

Table 2. Minerals of analyzed Anzer honey samples.

Honey samples	Potassium	Calcium	Sodium	Magnesium
AH1	1265.87	299.56	289.41	41.54
AH2	1386.23	300.78	294.41	45.65
AH3	1452.32	301.75	301.74	48.65
AH4	1657.52	301.47	302.47	48.62
AH5	1956.87	302.52	307.65	49.41
AH6	2652.14	312.42	385.47	52.47
AH7	3256.74	684.14	547.68	65.74
AH8	4625.98	768.23	557.87	78.41
AH9	5468.23	798.65	561.24	69.74
AH10	2365.87	402.87	398.47	55.84
AH11	4020.35	704.89	524.65	66.87
AH12	4374.21	735.41	536.41	68.79
AH13	1657.51	400.65	397.54	55.47
AH14	3024.87	627.54	498.65	56.87
AH15	1469.85	325.45	389.47	54.65
AH16	3542.65	697.31	538.97	79.47
AH17	2147.63	311.41	384.54	53.21
AH18	2687.32	598.25	532.14	89.87
AH19	4217.41	728.69	565.14	84.54
AH20	5662.37	823.65	589.21	88.65
AH21	5887.65	854.36	591.45	90.54
Mean	3084.74	537.14	445.16	64.05
SD	3268.09	392.3	213.57	34.65
Min	1265.87	299.56	289.41	41.54
Max	5887.65	854.36	591.45	90.54

Heat treatment is usually applied to prevent the tendency of the honey to crystallize, to remove the crystal appearance from the center and to neutralize the honey-infecting microorganisms. Depending on the temperature and duration, honey heat treatment may decrease the amount of vitamins, nutrients and diastase activity in honey and increase the amount of HMF. For this reason, the HMF content of a honey sample gives information about the temperature grade of the applied process. However, in this regard, the chemical composition of honey must also be taken into account (Kambur et al., 2015). HMF is usually not found in newly produced honey, and increases with time due to conditions and storage (Chakir et al., 2011). HMF is a substance which has harmful effects on human health, resulting in the storage of carbohydrates or storage in environments that are not heat-stable. Pehlivan

and Gül, (2015) reported HMF levels of 12.8 mg/kg and 20.32 mg/kg in the case of *Euphorbia echinus* and *Euphorbia resinifera* honey and 30.43 mg/kg in thyme honey. In general, the HMF content of the honey samples of the Anzer honey samples varied between 1.82-17.80 mg/kg. All samples were tested for the highest value of 40 mg/kg, which was determined for the Turkish Food Codex Honey Communiqué and the European Union standards for HMF value and they are found to be in conformity with the aforementioned standards for HMF by the European Community regulations (Feás et al., 2015). Diastase is an enzyme naturally found in the structure of honey. The amount in the honey may vary depending on the geographical and origin of the flora. On the other hand, the freshness of the honey also affects the number of diastases in the honey. Along with HMF, diastase

activity has been exposed to heat and can be used as an indicator of long-standing happiness (Karadal and Yıldırım, 2012). It has been reported that the source of diastase and invertase enzymes as a common result of the studies made is the salivary secretions of each of these (Won et al., 2009). The diastase number is a quality parameter and is used to determine whether honey has been subjected to heat treatment until packaged and delivered to the consumer. Still heat treatment is usually applied to prevent the tendency of the honey to crystallize, to remove the crystal appearance from the surface, to neutralize the microorganisms and to reduce the viscosity. However, depending on the thermal treatment applied to the honey, the quality of the wax results in loss of quality due to the temperature and duration of application, causing the diastase activity to decrease and the amount of HMF to increase (Karadal and Yıldırım, 2012). In general, the diastase of the Anzer honey samples varied between 9.42-38.41 mg/kg. Electrical conductivity (EC) varies depending on the proportion of honey, especially minerals, total ash, salts, proteins and acid. As the mineral and acid ratio of honey increased, the electrical conductivity increased accordingly (Da Silva et al., 2016). The results obtained after examining twenty-one honey samples show that the EC values are between 0.26-0.79 mS/cm. Thus, this parameter is a good criterion for the identification of honey floras, the definition of flower honey and honey bees (Lazarević et al., 2012). In the other two studies, electrical conductivity values of flower honey samples were determined as 0.69 mS/cm and 0.19 mS/cm, respectively (Fallico et al., 2004). It was determined that the conductance values we determined in our study were partially close to those. According to Turkish Food Codex Honey Communiqué and European Union standards, flower honey electrical conductivity should be lower than 0,8 mS/cm (Anonymous, 2005). In this study, it was determined that the honey samples are suitable to these standards. One of the most important factors affecting the visibility of honey is the color. The materials responsible for the honey color are not exactly known, but the color of the honey, can vary from white to dark brown depending on the plant

source, storage period and conditions (Krell, 1996). Honey color is associated with the amount of phenolic acids, chlorophyll, carotene and xanthophyll protonocyanidins and flavonoids and minerals present in the honey (González-Paramás et al., 2007). Many studies have shown that the amount of antioxidant is higher in dark colored honey than in light colored honey (Pontis et al., 2014). Color values of the honeys are given in Figure 1. Color values of honeys are expressed as L* for darkness/lightness (0 black, 100 white), a* (-a greenness, +a redness), and b* (-b blueness, +b yellowness). Honey color is mainly composed of total mineral (ash) content, and light colored honey is generally associated with low ash content. Honey color depends on the flora involved and on associated vitamin, pigment, phenolic substance, mineral contents, pollen color, nonenzymatic browning reactions and the waiting period after harvest. Comparing our results with values in the previous literature, the samples exhibited lower L values, defined as dark-color honeys. Light-colored honeys are reported to have L values lower than 50, and our L values AH1, AH2, AH7, AH8, AH9, AH10 and AH20 were also below 50. Dark-colored honeys are reported to have L values higher than 50, and our L values AH3, AH4, AH5, AH6, AH11, AH12, AH13, AH14, AH15, AH16, AH17, AH18, AH19 and AH21 were also above 50. Dark-colored honeys are reported to have a stronger taste, while light-colored honeys have a delicate flavor (Nombré et al., 2016). The phenolic content of Anzer honey and the difference in color may be indicative of the presence of different nectar resources in the surrounding area, rather than the single source of nectar.

Bioactive properties

Among the components responsible for antioxidant, antimicrobial and antiinflammatory properties of honey are phenolic compounds (Kolaylı et al., 2016). In this study, total phenolic content (TPC) of honey was determined by the method of Folin-Ciocalteu. The results of the total phenolic content analysis are shown in Figure 2. The lowest TPC value was 802.6 µg GAE/g honey in AH₆ and the highest TPC value was 1352, 6 µg GAE/g honey in AH₁. In a study

by Noor et al., (2014) the total amount of phenolic substances in natural and commercial honey is 36.01-252.00 and 1.33-140.55 GAE mg/100g, respectively; Wilczyńska, (2014) reported 40.5-177 mg GAE/100 g. Silva et al.,

(2013b) reported to be 31,91 mg GAE/100g. Compared with the results obtained from our study, it was concluded that the phenolic content of the honey samples is quite high.

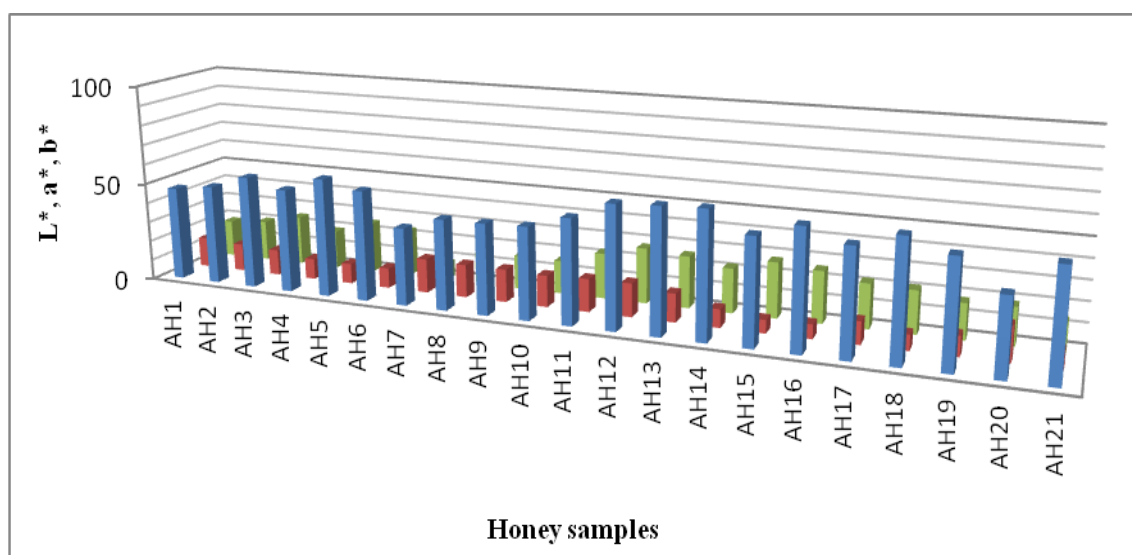


Figure 1 . Color of honey samples

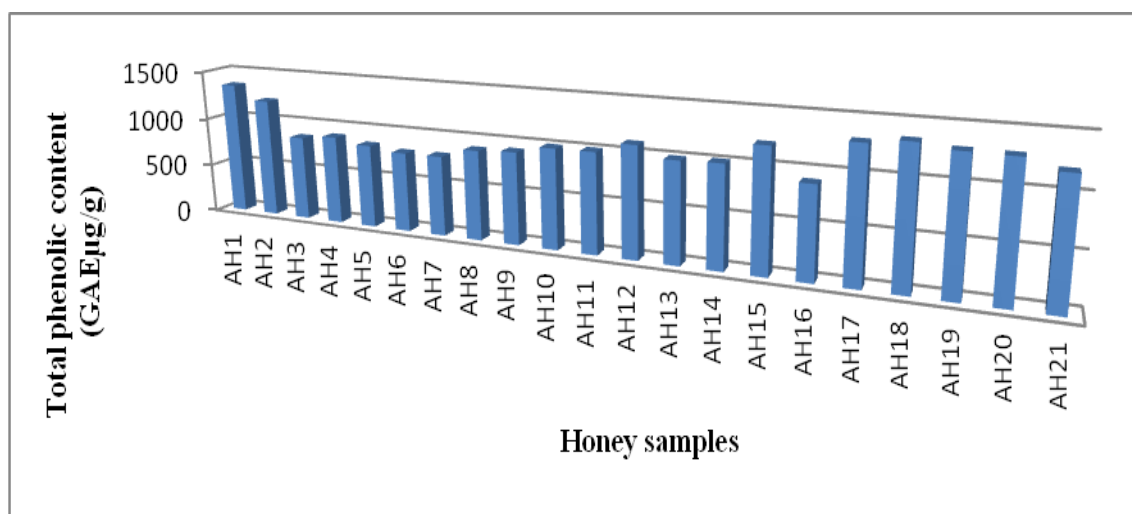


Figure 2 . Total phenolic content of honey samples (GAEµg/g)

Antioxidants present naturally in honey; they exhibit antioxidant effects through free radical linkers, reducing agents, metal chelators, or singlet oxygen scavenging mechanisms and have a positive effect on metabolism. The DPPH method was used to determine the antioxidant content of the samples. According to this, the

antioxidant content of honey samples ranged from 9.12-20.69 $\mu\text{mol TE/g}$ (Figure 3). The highest value is 20.69 $\mu\text{mol TE/g}$ in AH₁ and the lowest value is 9.12 $\mu\text{mol TE/g}$ in AH₆. Gasic et al., (2014) found the amount of antioxidants in Serbian honey samples to be 1.31-25.61 $\mu\text{mol TE/g}$ by DPPH method. Gethin et al., (2008) found

that the highest antioxidant activity was 1.22 $\mu\text{mol TE/g}$ in the highest water and 0.48 $\mu\text{mol TE/g}$ in the lowest pineapple. Halim et al., (2011) reported an antioxidant value of 0.38-0.59 $\mu\text{mol TE/g}$ in samples of Indian honey specimens. The antioxidant content results of the present study samples are generally found higher than above studies.

TE/g in samples of Indian honey specimens. The antioxidant content results of the present study samples are generally found higher than above studies.

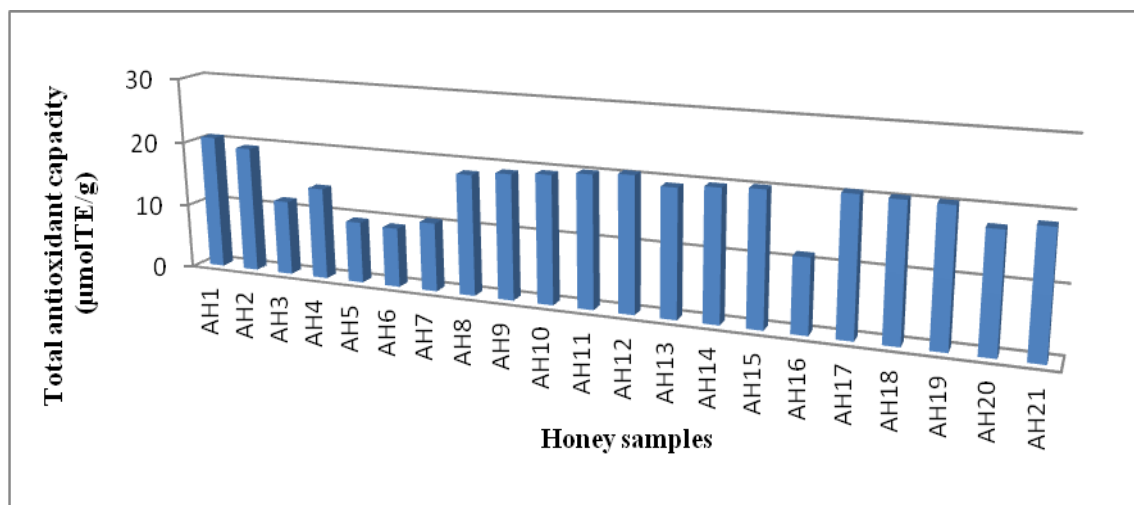


Figure 3. Total antioxidant capacity of honey samples ($\mu\text{molTE/g}$)

CONCLUSION

In this study, twenty-one samples of the Anzer honey were investigated for their physicochemical properties such as pH, electrical conductivity, fructose, glucose composition and HMF. The obtained data allows us to evaluate the quality of twenty-one over-all honey samples and to create some rules that emphasize their qualities. The results also show that twenty-one Anzer honey samples are characterized by total phenolic content (TPC) and total antioxidant content (TAC). It is believed that these components can provide great economic and/or industrial benefits due to applications in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. In the end, honey is a natural product with a number of distinctive therapeutic properties. However, it is suggested that more elaborated studies reveal other hidden features of Anzer honey. Knowing the boundaries of reference values for biochemical and physicochemical values on a regional basis is of great importance in terms of reaching the information needed for product export. Results of this study should be confirmed by similar study results of which are due to the fact that the plant richness of Eastern Black Sea region to determine

the standard reference values that represents these regions.

REFERENCES

- Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B. (2007). Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chem.*, 101: 695-703.
- Ajlouni, S., Sujirapinyokul, P. (2010). Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. *Food Chem.*, 119 (3): 1000-1005.
- Al-Doghairi, M.A., Al-Rehiyani, S., Ibrahim, G.H., Osman, K.A. (2007). Physicochemical and antimicrobial properties of natural honeys produced in Al-Qassim region, Saudi Arabia Met. *Env Arid Land Agric Sci.* 18(2): 3-18.
- Anonymous, (1997). Analysis of honey, determination of the content of saccharides, fructose, glucose, saccharose, turanose and maltose, HPLC method. DIN 10758.
- Anonymous, (1998). NMKL Method. Nordic Committee on Food Analysis. Oslo, Norge.

- Anonymous, 2001. Codex Alimentarius. Draft revised standard for honey. Alinorm 01/25 19-26. and EU Council (2002) Council Directive 2001/11 O/EC of 20 December 2001 relating to honey. Official Journal of the European Communities L10, 47-52.
- Anonymous, (2002). TSE 3036. Honey Standard Turkish Standards Institute, Ankara.
- Anonymous, (2002). http://www.nhb.org/infropub/month/2002/10_2002_monthly_report.pdf. Retrieved, 2002
- Anonymous, (2002a). Determination of Hydroxymethylfurfural by HPLC. Harmonised Methods of International Honey Commission, 25 p, Bern, Switzerland.
- Anonymous, (2002b). Determination of electrical conductivity. Harmonised Methods of International Honey Commission, 15 p, Bern, Switzerland.
- Anonymous, (2005). Turkish Food Codex Regulation. Honey Communiqué-No 2005/49.
- Anonymous, (2006b). AOAC Official Method 920.181. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Methods of Analysis. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Anonymous, (2006c). AOAC Official Method 998.12. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Methods of Analysis. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Anupama, D., Bhat, K.K., Sapna, V.K. (2002). Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International*, 36: 183-191.
- Aydin, B.D., Sezer, C., Oral, N.B. (2008). Determination of quality components of strained honey marketed in kars. *The Journal of The Faculty of Veterinary Medicine University of Kafkas*, 14(1): 89-94, 2008.
- Batu, A., Küçük, E., Çimen, M. (2013). Eastern Anatolia and Eastern Black Sea Region Determination of Physicochemical and Biochemical Values of Flower Honeys Technological Researches: *GTED*, 8: 52-62.
- Bogdanov, S., Martin, P., Lullmann, C. (1997). Harmonised methods of the European Honey Commission. *Apidologie*, 28:1-59.
- Bogdanov, S., Edder, P. (2004). Sulfonamid belasteter Honig nach Herbizidanwendung, Schweiz. *Bienenzeitg*, 127: 20-21.
- Chakir, A., Abderrahmane, R., Gian, L.M., Paola, F. (2011). Physicochemical properties of some honeys produced from different plants in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 9(2): 946-954.
- Codex Alimentarius, (2001). Revised Codex standard for Honey, Codex Stand. 12-1981, revisions 1987 and 2001.
- Da Silva, R.M., Gauche, C., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196: 309- 232.
- Fallico, B., Zappala, M., Arena, E., Verzea, A. (2004). Effect of conditioning on hmf content in unifloral honeys. *Food Chemistry*, 85: 305-313.
- Feás, X., Pires, J., Iglesias, A. (2010). Estevinho Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. *Food Chem. Toxicol.* 48: 3462-3470.
- Gasic, U., Keckes, S., Dabic, D., Trifkovic, J., Milojkovic-Opsenica, D., Natic, M., Tesic, Z. (2014). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Serbian Polyfloral Honeys. *Food Chemistry*, 145: 599-607.
- Gethin, G.T., Cowman, S., Conroy, R.M. (2008). The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *Int. Wound J.* 5: 185-194.
- González-Paramás, A.M., García-Villanova, R.J., Báñez, J.A.G., Sánchez, J.S., Albajar, R. (2007). Botanical origin of monovarietal dark honeys (from heather, holm oak, pyreneanoak and sweet chestnut) based on their chromatic characters and amino acid profiles. *European food research and technology*, 226 (1): 87-92.

- Gul, A. (2008). Structural Properties of Food Safety Some of the produced honey in Turkey Investigation in terms of. *MKU Journal of Agricultural Faculty*, 21 (1): 48-56.
- Halim, A.S., Kishore, R.K., Syazana, M.S.N & Sirajudeen, K.N.S. (2011). Tualang Honey Has Higher Phenolic Content and Greater Radical Scavenging Activity Compared With Other Honey Sources. *Nutrition Research*, 31: 322-325.
- Kambur, M., Yıldız, İ., Kekeçoğlu, M. (2015). Evaluation of Honeys Chemical and Paninological Analysis Methods Produced in Düzce İli Yiğilca Region, *Uludağ Arıcılık Magazine*, 15 (12): 67-79.
- Karadal, F., Yıldırım, Y. (2012). Honey Quality Qualities, Importance in Feeding and Health, *Erciyes University Veterinary Faculty Magazine*, 197-209.
- Kolaylı, S., Sahin, H., Can, Z., Yıldız, O., Sahin, K. (2016). Honey shows potent inhibitory activity against the bovine testes hyaluronidase. *Journal of Enzyme Inhibition of Medicinal Chemistry*, 31(4): 599-602.
- Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services* 124: 87-113.
- Lachman, J., Kolihova, D., Miholova, D., Kosata, J., Titera, D., Kult, K. (2007). Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chem*, 101: 973-979.
- Lazarević, K.B., Andrić, F., Trifković, J., Tešić, Ž., Milojković-Opsenica, D. (2012). Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. *Food Chemistry*, 132: 2060-2064.
- Manzanares, A.B., García, Z.H., Galdón, B.R., Rodríguez, E.R., Romero, C.D. (2011). Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*, 126: 664-672.
- Nombré, P., Schweitzer, I.J., Boussim, J. (2016). Millogo/Rasolodimby, "Impacts of Storage Conditions on Physicochemical Characteristics of Honey Samples from Burkina Faso," *African Journal of Food Science*, 4 (7): 458-463.
- Noor, N., Sarfraz, R.A., Ali, S., Shahid, M. (2014). Antitümör and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. *Food Chemistry*, 143: 362-366.
- Pehlivan, T., Gül, A. (2015). Determination of Heavy Metals Contents of Some Monofloral Honey Produced in Turkey. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5 (8): 42-45.
- Pontis, J.A., Costa, L., Silva, S.J.R.D., Flach, A. (2014). Roraima, from Brazil, honey color, phenolic and flavonoid content and antioxidant activity. *Food cognition Technol*, 34: 69-73.
- Rashed, M.N., Soltan M.E. (2004). Major and trace elements in different types of Egyptian mono- floral and non-floral bee honeys. *J. Food Compos. Anal.* 17: 725-735.
- Sanz, M.L., Gonzales, M., Lorenzo, C., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (2005). A Contribution to the Differentiation Between Nectar Honey and Honeydew Honey. *Food Chemistry*, 91: 313-317.
- Silva, I.A.A., Silva, T.M.S., Camara, C.A., Neide-Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J.S., Soledade, L.E.B., Lima, E.O., Souza, A.L., Souza, A.G. (2013b). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, 141: 3552-3558.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic Phosphotungstic. *Acid Reagents*. 16: 144-158.
- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Fortuna, T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. *Food Chemistry*, 113 (2): 568-574.
- Solayman, M.d., Islam, M.d., Paul, S., Ali, Y., Khalil, M.d., Alam, N., Gan, S.H. (2016). Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15: 219-233.
- Velioglu, S., Köse, G. (1983). A study on the standard of sunflower ballast produced in our

- country (IS 3036). *Journal of Nutrition and Diet. Nutr. and Diet.* 17: 285-293.
- National Honey Board. 2002. Honey Health and Therapeutic qualities.
- White, J.W., Subers, M.H., Shepart, A.Y. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide, and its origin in a glucose-oxidase system. *Biochim. Biophys. Acta*, (73): 57-70.
- Wilczyńska, A. (2014). Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey. *Food Science and Technology*, 57: 767-774.
- Won, S.R., Li, C.Y., Kim, J.W., Rhee, H.I. (2009). Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*, (113):1334-1339.
- Yılmaz, H., Küfrevioğlu, I. (2001). Composition of Honeys Collected from Eastern and South-Eastern Anatolia and Effect of Storage on Hydroxymethylfurfural Content and Diastase Activity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25: 347-349.

DRYING CHARACTERISTICS OF RED BEET (*BETA VULGARIS ESCULENTACRUENTA*) PUREE IN A MICROWAVE OVEN

S. Nur Dirim^{1*}, Meryem Talih¹, Gülşah Çalışkan Koç²

¹Ege University, Department of Food Engineering, İzmir, Turkey

²Alanya Hamdullah Emin Paşa University, Art Faculty, Department of Gastronomy and Culinary Arts, Antalya, Turkey

Received / Geliş: 28.01.2019; Accepted / Kabul: 24.06.2019; Published online / Online baskı: 24.07.2019

Dirim, S. N., Talih, M., Çalışkan Koç, G. (2019). Drying characteristics of red beet (*Beta vulgaris esculentacruenta*) puree in a microwave oven. *GIDA* (2019) 44 (4): 654-671 doi: 10.15237/gida.GD19028

Dirim, S. N., Talih, M., Çalışkan Koç, G. (2019). Kırmızı pancar püresinin (*Beta vulgaris esculentacruenta*) mikrodalga fırında kuruma kinetiği. *GIDA* (2019) 44 (4): 654-671 doi: 10.15237/gida.GD19028

ABSTRACT

The aims of this study are to observe the effects of different microwave power and amount of samples on the drying characteristics of red beet puree, to determine the physical properties of the red beet powders and to calculate the energy efficiency of the drying process. The drying experiments were conducted at five different microwave power and thicknesses of the sample. Seven thin-layer drying models were fitted to the experimental data and Page model which had the highest R² and lowest χ^2 and RMSE for all drying experiments was found to satisfactorily describe the drying behavior of red beet puree. The total drying times increased depending on an increasing amount of sample and decreasing microwave power. The D_{eff} and E_a values ranged between 1.095E-08 to 3.438E-06 m².s⁻¹ and 14.35 to 77.35W.g⁻¹, respectively. The energy efficiency values of the drying processes are evaluated in terms of MER and SEC.

Keywords: Red beet puree, microwave drying, thin layer modeling, effective moisture diffusivity, energy consumption, activation energy

KIRMIZI PANCAR PÜRESİNİN (*BETA VULGARIS ESCULENTACRUENTA*) MİKRODALGA FIRINDA KURUMA KİNETİĞİ

ÖZ

Bu çalışmanın amaçları farklı mikrodalga güçleri ve ürün miktarlarının kırmızı pancar püresinin kuruma karakteristiği üzerine etkisinin gözlenmesi, elde edilen kırmızı pancar püresi tozunun fiziksel özelliklerinin belirlenmesi ve kurutma işleminin verimliliğinin hesaplanmasıdır. Bu amaçla, kurutma çalışmaları beş farklı mikrodalga gücü ve ürün kalınlığında gerçekleştirilmiştir. Kırmızı pancar püresinin kuruma kinetiğinin belirlenmesi için, yedi ince tabaka kuruma modeli deneysel verilere uyarlanmıştır. En yüksek R² ve en düşük χ^2 ve RMSE değerleriyle Page modelin kırmızı pancar püresinin kuruma davranışını tanımladığı gözlenmiştir. Kırmızı pancar püresinin kuruma süresi artan örnek miktarı ve azalan mikrodalga gücüyle artmıştır. Ayrıca, etkin nem difüzyonu ve aktivasyon enerjisi değerleri sırasıyla 1.095E-08 - 3.438E-06 m². s⁻¹ ve 14.35 - 77.35W. g⁻¹ arasında değişmiştir. Kurutma işlemlerinin enerji verimliliğinin belirlenmesi için nem uzaklaştırma hızı (MER) ve özgül enerji tüketimi (SEC) değerleri hesaplanmıştır.

Anahtar kelimeler: Kırmızı pancar püresi, mikrodalga kurutma, ince tabaka modelleme, etkin nem difüzyonu, enerji tüketimi, aktivasyon enerjisi

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ nur.dirim@ege.edu.tr,

☎ (+90) 232 311 3032

☎ (+90) 232 311 4831

INTRODUCTION

Red beet (*Beta vulgaris esculentacruenta*) being one of the important root vegetable crops in the world, is also one of the major sources of betalains which are used both as natural colorants to enhance the redness of different food products such as dairy products, ice creams, jams, tomato paste, beverages, desserts, and important minerals (calcium, magnesium, potassium, and sodium) (López et al., 2009; Obón et al., 2009). Agricultural products continue their respiratory activity which causes deterioration of products quickly even after harvest. Drying is an alternative method to increase the post-harvest durability of agricultural products (Ertekin and Yaldiz, 2004; Alibas, 2006). Drying can be accomplished using many different methods such as spray, freeze, sun, microwave drying, etc. The most common drying methods are the sun and convective drying which at the same time have some disadvantages such as long drying time, microbial growth, loss of nutritional content, and high amount of energy consumption, etc. (Toğrul, 2006). For the given reasons above, the alternative drying methods must be used for decreasing the drying time and energy consumption and preventing the loss of nutritional compounds (Alibas - Özkan et al., 2007). In recent years, microwave drying has become a widely used method due to a decrease in drying time and energy consumption and the protection of the nutrients content (Alibas, 2006). In microwave heating, the internal generation of heat provides fast and uniform heating throughout the food product. Microwave drying results in high drying rates of the food because of the quick absorption of energy by the water molecules that cause rapid evaporation of water, therefore, creates an outward flux of rapidly escaping vapor from the food (Sharma and Prasad, 2006). The energy consumption of microwave drying is low because of the volumetric heating effect by microwaves, which reduced the drying time considerably. The microwave drying method was used for several kind of foods such as corn husk (Akdoğan et al., 2017), Swiss chard leaves (Alibas, 2006), spinach (Alibas-Özkan et al., 2007), kiwifruits (Maskan, 2001), banana (Maskan, 2000), nettle leaves (Alibas, 2007), mint (Özbek and Dadalı 2007),

apple pomace (Wang et al., 2007a), and celery leaves (Demirhan and Ozbek, 2011).

There are several types of research related with the drying of red beet using methods such as freeze-drying (Lejeune et al., 1991), tray drying (Kaleta and Gornicki, 2010), hot air drying (Gökhlæ and Lele, 2011), microwave-convection drying (Singh et al., 2013), and spray drying red beet juice (Koul et al., 2002). So far, there is no published study about modeling and effective diffusivity of the microwave drying of red beet puree. The studies on the drying of red beet, which has a high amount of betalain pigments, provides a great significance for obtaining natural colorants (Bazaria and Kumar, 2016), increasing the consumption, creating new usage areas, and reducing environmental pollution by recycling the red beets produced in excess amounts of the demand. In addition, the dried products have some advantages such as easy-storage, smart-packaging, and easy transportation, and they can be used as natural and easily measurable ingredients in food recipes (Çalışkan and Dirim, 2013). The aims of this study are to observe the effects of different microwave power settings (in Watt) and the amount (grams) of the samples on the drying characteristics of red beet puree, to determine the physical properties of the obtained red beet powders and to calculate the energy efficiency of the drying process.

MATERIAL AND METHODS

Materials

The red beets were purchased from a local supermarket in Izmir, Turkey and were washed, peeled, and mashed with a home type blender (Tefal Smart, MB450141, Turkey).

Microwave Drying

The experiments were performed using a domestic microwave oven (Arçelik MD 595, Turkey) at 2450 MHz with a maximum output power of 900 W. The dimensions of the microwave inner cavity were 220x 330x 360mm. The drying experiments were performed at five different microwave power settings (180, 360, 540, 720, and 900W). The oven has a glass plate with a 300 mm diameter at the base of the oven.

Five different sample amounts (9, 12, 15, 18, and 21g) (corresponding to the thicknesses of 3, 4, 5, 6, and 7mm) were placed in petri dishes as a thin layer on the rotating glass plate in the oven. In order to determine the moisture losses, the petri dishes were taken out at uniform intervals (30s) and weighed using a digital scale with an 0.01 precision (Ohaus AR2140, USA). The drying experiments were completed when the weight of the sequent samples reached the same weight. The powder was obtained by grinding the dried material for one minute in a home type blender (Tefal Smart, MB450141, Turkey). Then, the powders were stored in heat-sealed aluminum-laminated multilayer commercial polyethylene packaging materials in the dark at room temperature until further tests were carried out.

Mathematical modeling of the drying data

The moisture ratio (MR) of the red beet puree samples was calculated during the microwave drying using equation (1).

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_o - M_e} \quad (1)$$

Where M_o , M_t , and M_e represent the initial, anytime, and equilibrium moisture contents (kg water/kg dry matter, (DM)), respectively. The drying data was fitted to seven well-known thin layer drying models (Page, Jena and Das, Two Term Exponential, Diffusion, Midilli, Logarithmic, and Wang and Singh models) (Jaya and Das, 2007; Erbay and Icier, 2009). The coefficient of determination (R^2), root mean square error (RMSE), and the reduced chi-square (χ^2) values were determined according to Ergün et al. (2016). The higher values of the coefficient of determination (R^2) and the lower values of the root mean square error (RMSE), and reduced chi-square (χ^2) were chosen for the goodness of fit (Celma et al., 2008).

For the determination of the effective moisture diffusivity (D_{eff}) values of the red beet puree Fick's diffusion model (Eq. 2) was used:

$$MR = \frac{8}{\pi} \sum_{i=1}^{\infty} \frac{1}{(2i-1)^2} \exp\left[-(2i-1)^2 \pi^2 \frac{D_{eff}}{4L^2} t\right] \quad (2)$$

where t is the time (s), D_{eff} is the effective moisture diffusivity (m^2s^{-1}) and L (m) is the thickness of the sample. For long drying times

($MR < 0.6$) (Crank, 1975), a limiting case of Eq. (3) is obtained, and expressed in a logarithmic form:

$$\ln MR = \ln\left(\frac{8}{\pi^2}\right) - \left(\frac{\pi^2 D_{eff}}{4L^2}\right) t \quad (3)$$

The effective moisture diffusivity is typically calculated by plotting the experimental moisture ratio versus the drying time. From Eq. (3), a plot of $\ln MR$ versus the drying time gives a straight line with the slope given in Eq. (4).

$$\text{Slope} = \frac{\pi^2 D_{eff}}{4L^2} \quad (4)$$

The modified Arrhenius type of exponential model as given in Eq. (5) is used for the calculation of effective moisture diffusivity.

$$D_{eff} = D_0 \exp\left(-E_a \frac{m}{p}\right) \quad (5)$$

Where D_{eff} is the effective moisture diffusivity ($m^2 \cdot s^{-1}$), D_0 is the pre-exponential factor ($m^2 \cdot s^{-1}$), E_a is the activation energy (W. g^{-1}), P is the microwave power (W) and m are the mass of the sample (g). The same form of the modified Arrhenius equation was also used for the determination of the reaction rate constant as given in Eq. (6):

$$k = k_0 \exp\left(-E_a \frac{m}{p}\right) \quad (6)$$

Where k is the drying rate constant obtained using the Page equation (min^{-1}), k_0 is the pre-exponential constant (min^{-1}), E_a is the activation energy (W. g^{-1}), P is the microwave power (W), and m is the mass of sample (g).

Determination of the energy efficiency of microwave drying

The energy consumption of the microwave drying processes was measured using a power measurement device (Makel M310.2218, Turkey). In order to determine the effectiveness of microwave drying the moisture extraction rate (MER) and specific energy consumption (SEC) values were calculated using the following equations (Eq. 7 and 8) (Chua et al., 2002; Jindarat et al., 2011)

$$MER = \frac{\text{Amount of water removed during drying (kg)}}{\text{Drying time (h)}} \quad (7)$$

$$SEC = \frac{\text{Total energy supplied in drying process (kJ)}}{\text{Amount of water removed during drying (kg)}} \quad (8)$$

Physical analyses

The moisture content of the fresh red beet puree and the red beet powders were determined according to AOAC (2000). The water activity and color values of the samples were measured using a Testo-AG 400, Germany, water activity measurement device and a Minolta CR-400 Colorimeter, Japan. The total color changes (ΔE), Chroma, and Browning Index (BI) values were calculated according to Pathare et al. (2013).

Statistical analysis

The data was analyzed using the statistical software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, U.S.A.). The data was also subjected to the analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test ($\alpha=0.05$) to determine the difference between means. The drying experiments were replicated twice, and all the analyses were triplicated.

RESULTS AND DISCUSSION

Drying curves

The drying characteristics of the red beet puree samples during microwave drying were determined from the mass loss in the samples of the known initial moisture content ($87.00 \pm 0.01\%$, wet basis, wb). The drying experiments were conducted until the constant weight of the sample was obtained, and as expected, high amounts of moisture were removed in the early stages of drying and at the later stages, the removal of moisture decreased gradually. During the initial phase of the microwave drying, the absorption of microwave power is higher due to the higher moisture content of the red beet puree. Similar results were obtained by Demiray et al. (2017). The researchers reported that the moisture content of the onion slices was very high (89.83%) during the initial phase of the drying which resulted in higher absorption of microwave power

(328, 447, and 557 W) and higher drying rates due to the higher moisture diffusion. The moisture ratio with respect to the drying time was calculated using the moisture content data and fitted to the thin layer drying models (Page, Jena and Das, Two Term Exponential, Diffusion, Midilli, Logarithmic, and Wang and Singh models). The summary of the model parameters and statistical evaluations (R^2 , χ^2 , and RMSE) are given in Table 1.

The higher values of the coefficient of determination (R^2) and the lower values of root mean square error (RMSE), and reduced chi-square (χ^2) should be chosen for the goodness of fit (Celma et al., 2008). The calculated R^2 , RMSE, and χ^2 values ranged between 0.952 - 0.999, 0.0021 - 1.684, and 0.0001 - 1.3691, respectively. The lowest R^2 and highest RMSE, and χ^2 were obtained from the Midilli, Logarithmic, and Wang and Singh models. The Page model was chosen as the most suitable model for determining the microwave drying characteristics of the samples in different conditions. Although the average values of R^2 of the Page and Jena and Das model parameters were almost in the same range (0.980 - 0.999), the results indicated that the Page model has a higher R^2 and lower RMSE, and χ^2 values compared to the other models. The Page model was also found suitable for the determination of the drying characteristics of apple pomace (Wang et al., 2007a), celery leaves (Demirhan and Ozbek, 2011), onion (Demiray et al., 2017), carrot (Doymaz, 2004), and mint (Doymaz, 2006) in microwave oven drying. The experimental moisture ratio (EMR) and computed moisture ratio values of the Page model for five different microwave power settings and the amount of the samples are given in Fig. 1. (a-e with the order of increasing microwave power settings).

Table 1. The coefficients of the model equations obtained from the statistical analysis of the drying data

Sample Amount (g) <i>Miktarı (g)</i>	Microwave Power (W)	Page Model	Jena And Das Model	Two Term Exponential Model	Diffusion Model	Midilli Model	Logarithmic Model	Wang and Singh Model	
9	180	k=2.540E-6 n=1.938 R ² =0.999 RMSE=0.0111 χ ² =0.0001	k=0.003 a=-0.005 b=0.273 c=1.021 R ² =0.999 RMSE=0.6943 χ ² =0.5185	k=0.002 a=2.200 R ² =0.986 RMSE=0.0735 χ ² =0.0056	k=0.003 a=-89.405 b=0.986 R ² =0.990 RMSE=0.0465 χ ² =0.0023	k=0.001 a=1.119 b=0.000 R ² =0.980 RMSE=0.1717 χ ² =0.0311	k=0.001 a=1.635 b=-0.518 R ² =0.982 RMSE=0.1456 χ ² =0.0224	a=-0.001 b=-1.648E-7 R ² =0.973 RMSE=0.1064 χ ² =0.0117	
		360	k=8.861E-7 n=2.271 R ² =0.994 RMSE=0.0307 χ ² =0.0010	k=0.002 a=1.640 b=0.019 c=-0.689 R ² =0.992 RMSE=0.1256 χ ² =0.0178	k=0.004 a=2.296 R ² =0.967 RMSE=0.0708 χ ² =0.0053	k=0.006 a=-130.772 b=0.989 R ² =0.974 RMSE=0.0652 χ ² =0.0046	k=0.001 a=1.126 b=0.000 R ² =0.977 RMSE=0.3688 χ ² =0.1488	k=0.001 a=1.935 b=-0.826 R ² =0.979 RMSE=0.057 χ ² =0.0036	a=-0.001 b=3.215E-7 R ² =0.967 RMSE=0.2841 χ ² =0.0856
			540	k=1.627E-6 n=2.301 R ² =0.998 RMSE=0.0147 χ ² =0.0002	k=0.005 a=1.132 b=0.045 c=-0.195 R ² =0.983 RMSE=0.0757 χ ² =0.0068	k=0.006 a=2.287 R ² =0.974 RMSE=0.0683 χ ² =0.0051	k=0.008 a=-126.567 b=0.989 R ² =0.980 RMSE=0.0535 χ ² =0.0032	k=0.002 a=1.133 b=0.000 R ² =0.963 RMSE=0.2464 χ ² =0.0689	k=0.002 a=1.676 b=-0.543 R ² =0.965 RMSE=0.0929 χ ² =0.0098
	900	720	k=8.612E-5 n=1.887 R ² =0.996 RMSE=0.0222 χ ² =0.0006	k=0.013 a=1.016 b=0.078 c=-0.032 R ² =0.990 RMSE=0.0349 χ ² =0.0016	k=0.013 a=2.236 R ² =0.993 RMSE=0.0309 χ ² =0.0011	k=0.018 a=-71.951 b=0.982 R ² =0.995 RMSE=0.0257 χ ² =0.0008	k=0.008 a=1.129 b=0.000 R ² =0.964 RMSE=0.0760 χ ² =0.0069	k=0.007 a=1.206 b=-0.081 R ² =0.967 RMSE=0.0646 χ ² =0.0050	a=-0.005 b=6.127E-6 R ² =0.969 RMSE=0.0657 χ ² =0.0049
			540	k=2.751E-5 n=1.990 R ² =0.999 RMSE=0.0077 χ ² =0.0006	k=0.007 a=1.196 b=0.044 c=-0.213 R ² =0.995 RMSE=0.0619 χ ² =0.0050	k=0.009 a=2.249 R ² =0.990 RMSE=0.0420 χ ² =0.0020	k=0.013 a=-103.717 b=0.987 R ² =0.993 RMSE=0.0333 χ ² =0.0013	k=0.005 a=1.131 b=0.000 R ² =0.968 RMSE=0.1170 χ ² =0.0167	k=0.004 a=1.354 b=-0.226 R ² =0.971 RMSE=0.0667 χ ² =0.0054
		180	k=8.188E-6 n=1.795 R ² =0.999 RMSE=0.0074 χ ² =0.0001	k=0.003 a=-0.012 b=0.235 c=1.046 R ² =0.999 RMSE=0.1017 χ ² =0.0110	k=0.003 a=2.165 R ² =0.992 RMSE=0.0044 χ ² =0.0649	k=0.004 a=-80.913 b=0.985 R ² =0.995 RMSE=0.0485 χ ² =0.0025	k=0.001 a=1.128 b=0.000 R ² =0.982 RMSE=0.2071 χ ² =0.0452	k=0.001 a=1.398 b=-0.274 R ² =0.983 RMSE=0.0599 χ ² =0.0038	a=-0.001 b=2.864E-7 R ² =0.979 RMSE=0.1122 χ ² =0.0130
	12	360	k=7.132E-7 n=2.253 R ² =0.999 RMSE=0.0116 χ ² =0.0001	k=0.002 a=1.251 b=0.031 c=-0.330 R ² =0.989 RMSE=0.1469 χ ² =0.0243	k=0.003 a=2.291 R ² =0.976 RMSE=0.0838 χ ² =0.0074	k=0.005 a=-111.752 b=0.988 R ² =0.982 RMSE=0.0545 χ ² =0.0032	k=0.001 a=1.121 b=0.000 R ² =0.975 RMSE=0.2995 χ ² =0.0978	k=0.001 a=2.293 b=-1.170 R ² =0.976 RMSE=0.2280 χ ² =0.0567	a=-0.001 b=1.095E-7 R ² =0.963 RMSE=0.1220 χ ² =0.0158
			540	k=1.316E-5 n=1.903 R ² =0.998 RMSE=0.0162 χ ² =0.0003	k=0.004 a=1.117 b=0.034 c=-0.163 R ² =0.991 RMSE=0.0471 χ ² =0.0026	k=0.005 a=2.187 R ² =0.985 RMSE=0.0455 χ ² =0.0022	k=0.007 a=-88.890 b=0.986 R ² =0.989 RMSE=0.0398 χ ² =0.0018	k=0.002 a=1.113 b=0.000 R ² =0.978 RMSE=0.1882 χ ² =0.0395	k=0.002 a=1.505 b=-0.394 R ² =0.980 RMSE=0.0724 χ ² =0.0059
		720	k=6.081E-5 n=1.750 R ² =0.996 RMSE=0.0221 χ ² =0.0005	k=0.005 a=1.122 b=0.034 c=-0.142 R ² =0.994 RMSE=0.0332 χ ² =0.0013	k=0.007 a=2.131 R ² =0.987 RMSE=0.0426 χ ² =0.0020	k=0.009 a=-84.005 b=0.987 R ² =0.990 RMSE=0.0362 χ ² =0.0015	k=0.003 a=1.098 b=0.000 R ² =0.983 RMSE=0.1649 χ ² =0.0315	k=0.003 a=1.392 b=-0.298 R ² =0.985 RMSE=0.0533 χ ² =0.0033	a=-0.003 b=2.035E-6 R ² =0.985 RMSE=0.0506 χ ² =0.0028
900	k=1.817E-5 n=2.143 R ² =0.998 RMSE=0.0154 χ ² =0.0003	k=0.009 a=-0.026 b=0.371 c=1.076 R ² =0.981 RMSE=0.0697 χ ² =0.0062	k=0.011 a=2.236 R ² =0.984 RMSE=0.0024 χ ² =0.0465	k=0.015 a=-112.204 b=0.988 R ² =0.988 RMSE=0.0447 χ ² =0.0024	k=0.003 a=1.135 b=0.000 R ² =0.952 RMSE=0.0909 χ ² =0.0098	k=0.006 a=1.233 b=-0.103 R ² =0.955 RMSE=0.0766 χ ² =0.0070	a=-0.005 b=5.256E-6 R ² =0.967 RMSE=0.1293 χ ² =0.0187		

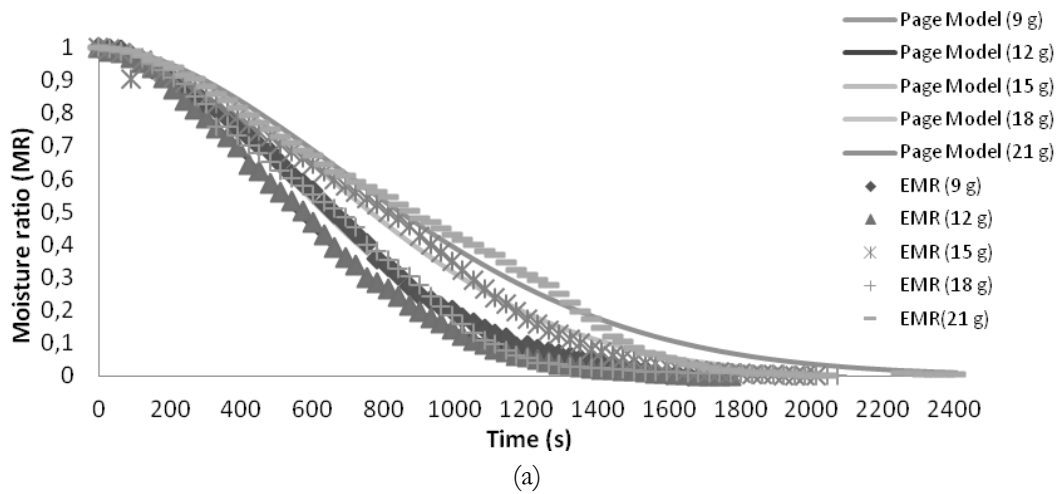
Microwave dried red beet puree powder

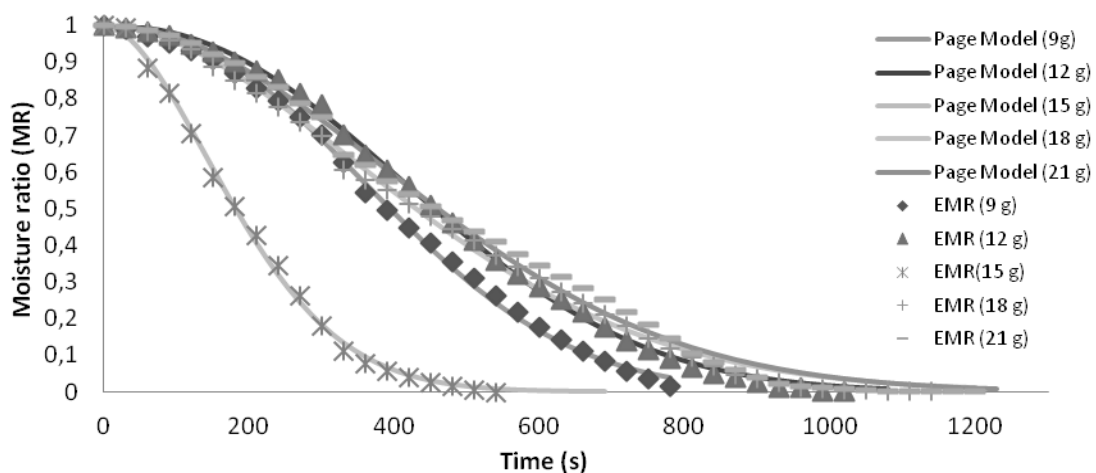
Table 1. continuing

Sample Amount (g) <i>Miktarı (g)</i>	Microwave Power (W)	Page Model	Jena And Das Model	Two Term Exponential Model	Diffusion Model	Midilli Model	Logarithmic Model	Wang and Singh Model
180		k=2.104E-6 n=1.915 R ² =0.992 RMSE=0.0111 χ^2 =0.0001	k=0.003 a=-0.003 b=0.264 c=0.986 R ² =0.998 RMSE=0.0217 χ^2 =0.0005	k=0.002 a=0.002 b=0.988 R ² =0.973 RMSE=0.6948 χ^2 =0.5054	k=0.003 a=-94.281 b=0.988 R ² =0.978 RMSE=0.0799 χ^2 =0.0067	k=0.001 a=1.059 b=0.000 R ² =0.988 RMSE=0.1189 χ^2 =0.0148	k=0.001 a=3.238 b=-2.177 R ² =0.989 RMSE=0.4047 χ^2 =0.1714	a=-0.001 b=2.114E-8 R ² =0.985 RMSE=0.4414 χ^2 =0.2009
		k=6.706E-5 n=1.778 R ² =0.997 RMSE=0.0249 χ^2 =0.0006	k=0.004 a=-0.090 b=0.205 c=1.182 R ² =0.983 RMSE=0.0441 χ^2 =0.0022	k=0.008 a=2.174 b=0.992 R ² =1.1120 RMSE=1.1120 χ^2 =1.3691	k=0.011 a=-92.927 b=0.987 R ² =0.994 RMSE=0.0266 χ^2 =0.0008	k=0.005 a=1.148 b=-0.00001 R ² =0.975 RMSE=0.0536 χ^2 =0.0032	k=0.005 a=1.221 b=-0.008 R ² =0.978 RMSE=0.7627 χ^2 =0.6464	a=-0.003 b=2.326E-6 R ² =0.975 RMSE=0.1653 χ^2 =0.0293
15	540	k=1.339E-5 n=1.930 R ² =0.997 RMSE=0.0175 χ^2 =0.0003	k=0.006 a=-0.010 b=0.348 c=1.046 R ² =0.997 RMSE=0.3079 χ^2 =0.1044	k=0.005 a=2.221 b=0.987 R ² =0.987 RMSE=0.0512 χ^2 =0.0029	k=0.007 a=-93.789 b=0.987 R ² =0.990 RMSE=0.0409 χ^2 =0.0019	k=0.003 a=1.142 b=0.000 R ² =0.972 RMSE=0.1071 χ^2 =0.0128	k=0.002 a=1.377 b=-0.239 R ² =0.974 RMSE=0.7315 χ^2 =0.5924	a=-0.002 b=1.257E-6 R ² =0.972 RMSE=0.1057 χ^2 =0.0119
		k=2.509E-5 n=2.101 R ² =0.997 RMSE=0.0181 χ^2 =0.0004	k=0.006 a=-0.091 b=0.243 c=1.192 R ² =0.966 RMSE=0.1857 χ^2 =0.0417	k=0.012 a=2.312 b=0.990 R ² =0.966 RMSE=0.0343 χ^2 =0.0014	k=0.017 a=-98.959 b=0.986 R ² =0.993 RMSE=0.0288 χ^2 =0.0010	k=0.007 a=1.166 b=0.000 R ² =0.958 RMSE=0.0876 χ^2 =0.0088	k=0.007 a=1.234 b=-0.073 R ² =0.962 RMSE=0.7464 χ^2 =0.6407	a=-0.004 b=4.489E-6 R ² =0.954 RMSE=0.1890 χ^2 =0.041
900		k=0.0001 n=1.707 R ² =0.998 RMSE=0.0493 χ^2 =0.0027	k=0.007 a=-0.030 b=0.327 c=1.073 R ² =0.995 RMSE=0.1814 χ^2 =0.0407	k=0.009 a=2.134 b=0.992 R ² =1.0647 RMSE=1.0647 χ^2 =1.3226	k=0.012 a=-86.928 b=0.987 R ² =0.994 RMSE=0.0275 χ^2 =0.0009	k=0.005 a=1.115 b=0.000 R ² =0.977 RMSE=0.0939 χ^2 =0.0103	k=0.005 a=1.238 b=-0.128 R ² =0.980 RMSE=0.7180 χ^2 =0.6014	a=-0.004 b=3.730E-6 R ² =0.988 RMSE=0.0498 χ^2 =0.0028
		k=2.302E-6 n=1.957 R ² =0.996 RMSE=0.0021 χ^2 =0.0001	k=0.004 a=-0.004 b=0.285 c=1.012 R ² =0.998 RMSE=0.2636 χ^2 =0.0738	k=0.002 a=2.199 b=0.980 R ² =0.986 RMSE=0.0367 χ^2 =0.0014	k=0.003 a=-84.341 b=0.986 R ² =0.989 RMSE=0.0311 χ^2 =0.0011	k=0.001 a=1.124 b=0.000 R ² =0.977 RMSE=0.1086 χ^2 =0.0123	k=0.001 a=1.588 b=-0.466 R ² =0.978 RMSE=0.4015 χ^2 =0.1614	a=-0.001 b=1.858E-7 R ² =0.970 RMSE=0.3688 χ^2 =0.1488
360		k=1.022E-5 n=1.835 R ² =0.996 RMSE=0.0179 χ^2 =0.0003	k=0.004 a=-0.009 b=0.286 c=1.035 R ² =0.999 RMSE=0.2392 χ^2 =0.0636	k=0.003 a=2.175 b=0.986 R ² =0.986 RMSE=0.0591 χ^2 =0.0038	k=0.005 a=-84.341 b=0.986 R ² =0.989 RMSE=0.0311 χ^2 =0.0011	k=0.001 a=1.110 b=0.000 R ² =0.985 RMSE=0.2757 χ^2 =0.0821	k=0.001 a=1.582 b=-0.474 R ² =0.986 RMSE=0.1452 χ^2 =0.1234	a=-0.001 b=3.898E-7 R ² =0.980 RMSE=0.265 χ^2 =0.0561
		k=3.636E-5 n=1.735 R ² =0.997 RMSE=0.0181 χ^2 =0.0004	k=0.005 a=-0.014 b=0.302 c=1.044 R ² =0.998 RMSE=0.1659 χ^2 =0.0316	k=0.005 a=2.137 b=0.989 R ² =0.987 RMSE=0.0372 χ^2 =0.0015	k=0.007 a=-119.350 b=0.990 R ² =0.979 RMSE=0.0517 χ^2 =0.0030	k=0.002 a=1.111 b=0.000 R ² =0.983 RMSE=0.1809 χ^2 =0.0363	k=0.002 a=1.382 b=-0.275 R ² =0.985 RMSE=0.2516 χ^2 =0.1234	a=-0.002 b=1.032E-6 R ² =0.984 RMSE=0.3524 χ^2 =0.2478
18	540	k=2.111E-5 n=1.930 R ² =0.990 RMSE=0.0322 χ^2 =0.0011	k=0.006 a=1.079 b=0.045 c=-0.115 R ² =0.985 RMSE=0.0439 χ^2 =0.0023	k=0.007 a=2.189 b=0.974 R ² =0.977 RMSE=0.0577 χ^2 =0.0038	k=0.009 a=-107.779 b=0.989 R ² =0.986 RMSE=0.0382 χ^2 =0.0020	k=0.004 a=1.131 b=0.000 R ² =0.963 RMSE=0.1019 χ^2 =0.0118	k=0.003 a=1.347 b=-0.220 R ² =0.971 RMSE=0.1129 χ^2 =0.0315	a=-0.003 b=2.042E-6 R ² =0.976 RMSE=0.4561 χ^2 =0.2345
		k=0.0011 n=1.830 R ² =0.991 RMSE=0.2431 χ^2 =0.0768	k=0.006 a=-0.084 b=0.252 c=1.157 R ² =0.980 RMSE=0.0606 χ^2 =0.0053	k=0.012 a=2.192 b=0.983 R ² =0.983 RMSE=0.0415 χ^2 =0.0024	k=0.016 a=-107.779 b=0.989 R ² =0.986 RMSE=0.0382 χ^2 =0.0020	k=0.007 a=1.133 b=0.000 R ² =0.968 RMSE=0.0774 χ^2 =0.0082	k=0.007 a=1.218 b=-0.097 R ² =0.972 RMSE=0.1266 χ^2 =0.0548	a=-0.005 b=4.866E-6 R ² =0.971 RMSE=0.3888 χ^2 =0.2578

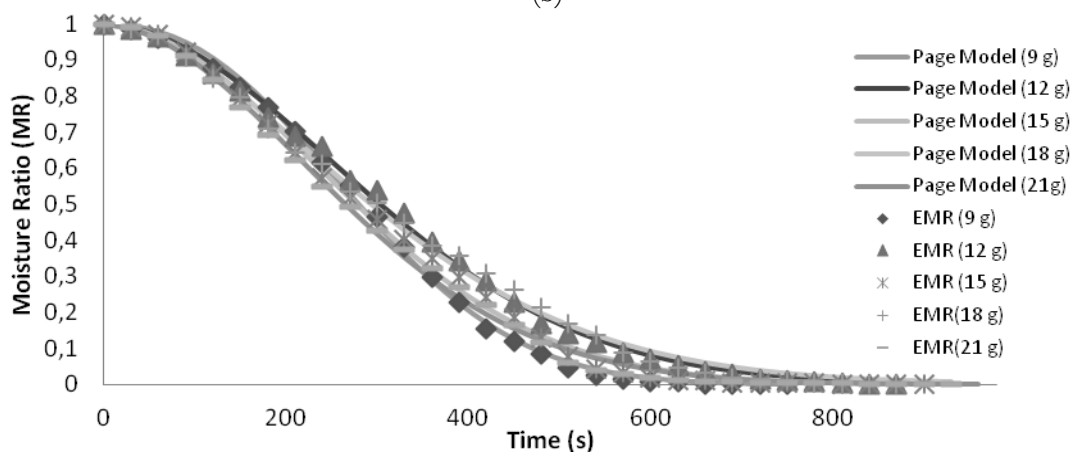
Table 1. continuing

Sample Amount (g) <i>Miktarı (g)</i>	Microwave Power (W)	Page Model	Jena And Das Model	Two Term Exponential Model	Diffusion Model	Midilli Model	Logarithmic Model	Wang and Singh Model
21	180	k=3.303E-6 n=1.819 R ² =0.989 RMSE=0.0112 χ ² =0.0001	k=0.004 a=-0.020 b=0.154 c=1.054 R ² =0.998 RMSE=1.0628 χ ² =1.1852	k=0.002 a=2.121 R ² =0.976 RMSE=0.0135 χ ² =0.0002	k=0.002 a=-70.502 b=0.984 R ² =0.980 RMSE=0.0393 χ ² =0.0616	k=0.001 a=1.049 b=-0.001 R ² =0.997 RMSE=1.0851 χ ² =1.2206	k=0.001 a=24.006 b=-22.957 R ² =0.997 RMSE=1.684 χ ² =1.259	a=-0.001 b=4.509E-8 R ² =0.994 RMSE=0.4288 χ ² =0.1699
	360	k=4.011E-6 n=1.967 R ² =0.996 RMSE=0.0180 χ ² =0.0003	k=0.005 a=-0.006 b=0.307 c=1.034 R ² =0.998 RMSE=0.2446 χ ² =0.0659	k=0.003 a=2.235 R ² =0.983 RMSE=0.0551 χ ² =0.0033	k=0.005 a=-98.789 b=0.987 R ² =0.987 RMSE=0.0282 χ ² =0.0009	k=0.002 a=1.133 b=0.000 R ² =0.978 RMSE=0.2659 χ ² =0.0759	k=0.001 a=1.583 b=-0.452 R ² =0.979 RMSE=0.5423 χ ² =0.2568	a=-0.001 b=3.501E-7 R ² =0.970 RMSE=0.2458 χ ² =0.1988
	540	k=2.030E-5 n=1.868 R ² =0.998 RMSE=0.0152 χ ² =0.0003	k=0.006 a=-0.018 b=0.302 c=1.070 R ² =0.996 RMSE=0.2238 χ ² =0.0573	k=0.006 a=2.205 R ² =0.989 RMSE=0.0322 χ ² =0.0011	k=0.008 a=-92.375 b=0.987 R ² =0.992 RMSE=0.0284 χ ² =0.0009	k=0.003 a=1.150 b=0.000 R ² =0.972 RMSE=0.1051 χ ² =0.0122	k=0.003 a=1.304 b=-0.159 R ² =0.974 RMSE=0.1049 χ ² =0.0198	a=-0.002 b=1.413E-6 R ² =0.977 RMSE=0.3548 χ ² =0.1248
	720	k=3.046E-6 n=2.329 R ² =0.999 RMSE=0.0104 χ ² =0.0001	k=0.007 a=-0.025 b=0.322 c=1.105 R ² =0.981 RMSE=0.1349 χ ² =0.0214	k=0.008 a=2.317 R ² =0.981 RMSE=0.0445 χ ² =0.0022	k=0.011 a=-126.193 b=0.989 R ² =0.986 RMSE=0.0399 χ ² =0.0018	k=0.005 a=1.184 b=0.000 R ² =0.948 RMSE=0.0811 χ ² =0.0074	k=0.004 a=1.298 b=-0.119 R ² =0.952 RMSE=0.0854 χ ² =0.0064	a=-0.003 b=2.586E-6 R ² =0.959 RMSE=0.3690 χ ² =0.1587
	900	k=4.253E-5 n=1.875 R ² =0.998 RMSE=0.0138 χ ² =0.0002	k=0.007 a=-0.029 b=0.318 c=1.089 R ² =0.991 RMSE=0.0514 χ ² =0.0032	k=0.008 a=2.208 R ² =0.991 RMSE=0.0352 χ ² =0.0014	k=0.012 a=-87.314 b=0.986 R ² =0.994 RMSE=0.0319 χ ² =0.0012	k=0.005 a=1.146 b=0.000 R ² =0.968 RMSE=0.0786 χ ² =0.0071	k=0.005 a=1.250 b=-0.110 R ² =0.971 RMSE=0.0687 χ ² =0.1688	a=-0.004 b=3.082E-6 R ² =0.978 RMSE=1.2588 χ ² =0.6845

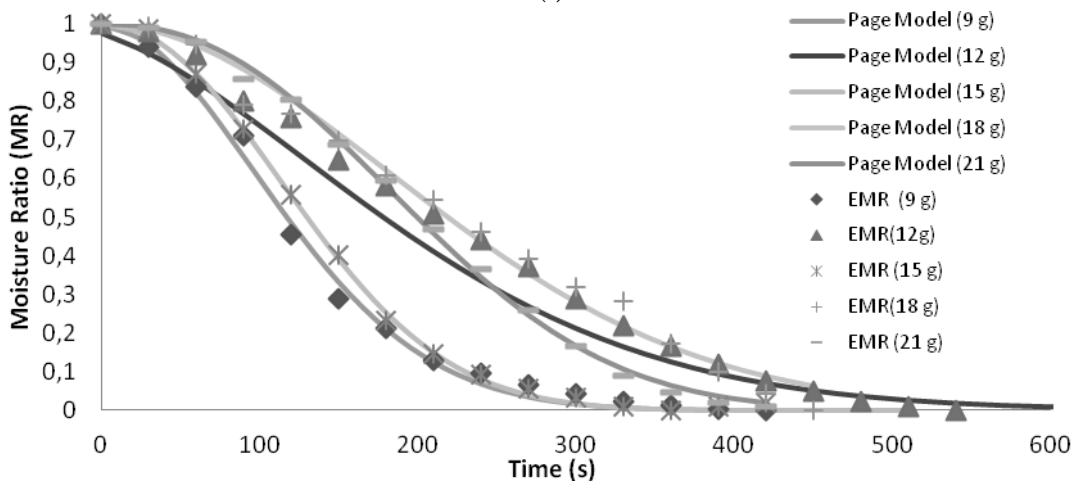




(b)



(c)



(d)

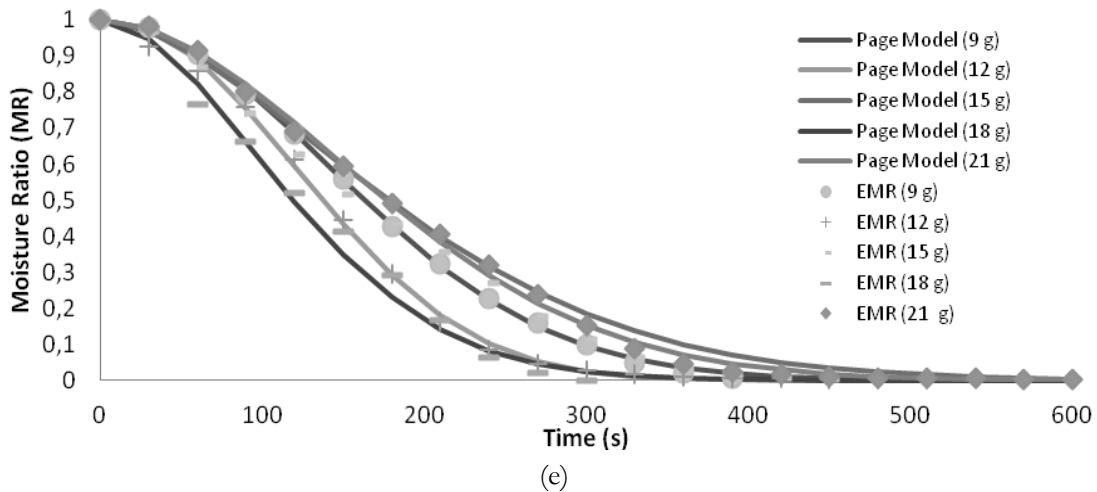
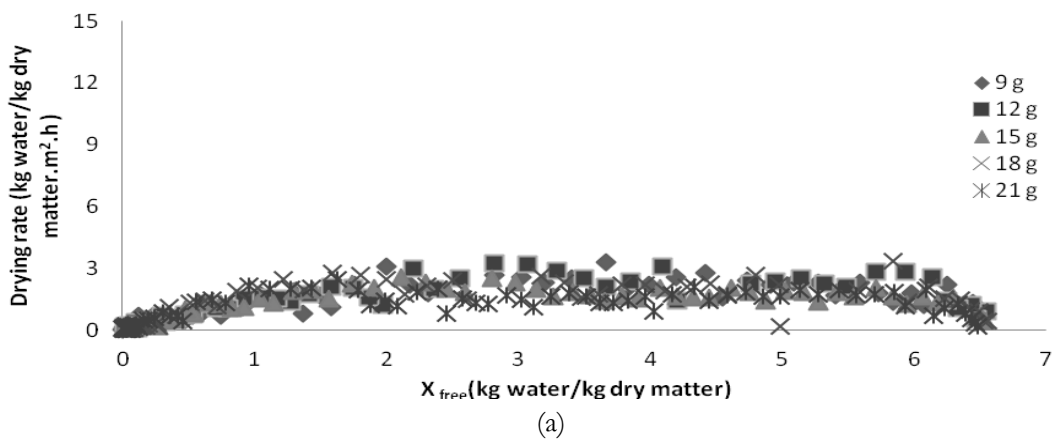
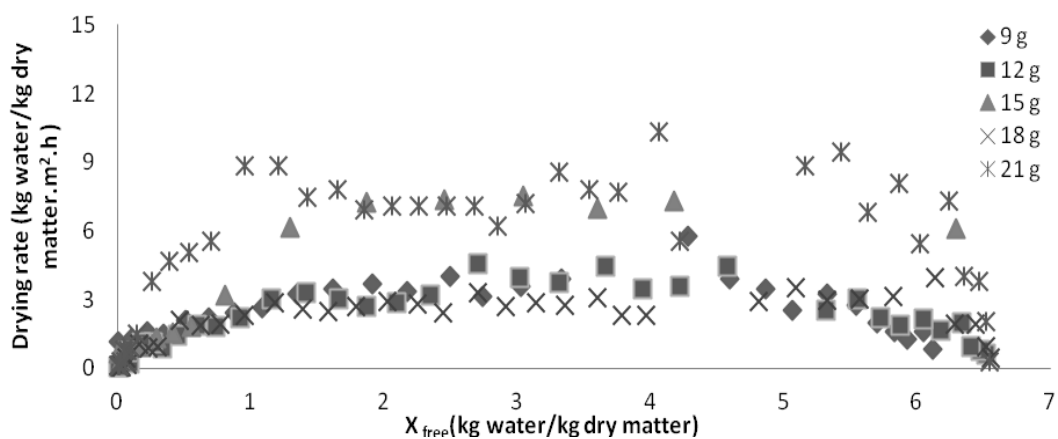


Fig. 1. The experimental moisture ratio values of red beet puree at different microwave powers ((a) 180W, (b) 360W, (c) 540W, (d) 720W and (e) 900W)

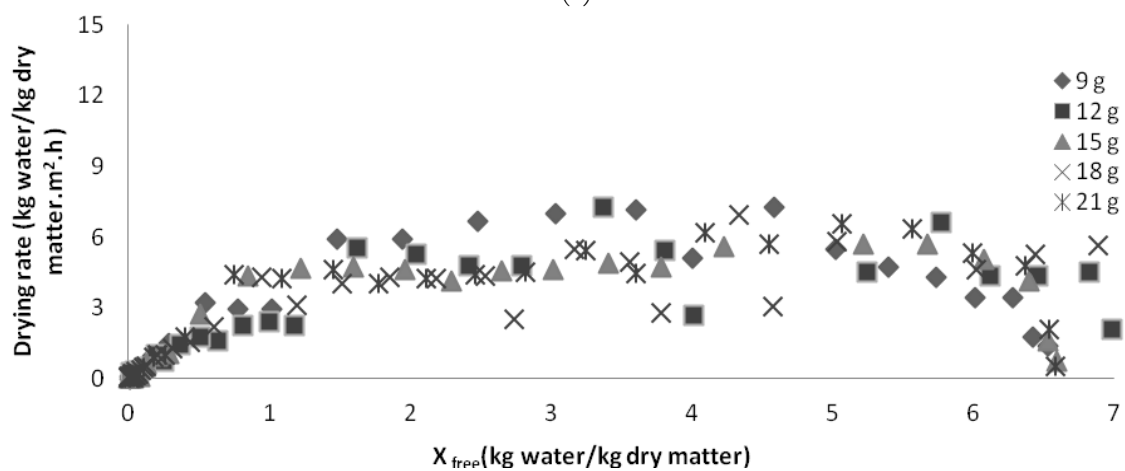
According to Fig. 1., it can be seen that the drying time decreased depending on the increase of microwave power and the drying time of the samples dried at 900W was found to be less than half of the drying time of the samples that are dried at 180W. It may be due to the rapid mass transfer in the sample at the high microwave power due to higher generation in the sample. For this reason, the higher generation rate may result in a higher evaporation rate and lower drying time. Similar results were obtained by Süfer et al. (2017), who studied the microwave drying of onion slices of two different thicknesses (3 and 7mm) and three different microwave power settings (80, 240, and 400W). The researchers reported that the internal water heating and evaporation rate were influenced by the microwave power and thus, a higher vapor

pressure difference occurs in the center and surface of the samples. The drying time, when the moisture ratio reached 0.5, was measured as between 11.0 - 14.5, 6.5 - 7.5, 5.0 - 5.5, 1.8 - 3.2, and 2.8 - 2.9 min for red beet puree at the output power settings of 180, 360, 540, 720, and 900W, respectively (Fig. 1), accounting for 35.4 - 40.7%, 37.5 - 50.0%, 35.5 - 40.0%, 26.2 - 45.3%, and 25.4 - 41.1% of the corresponding total drying time. Increasing the mass of the sample resulted in a longer drying time. Similar results were obtained by Süfer et al., 2017, and Dadali et al., 2007a. The drying rates were calculated (kg water/kg dry matter.h.m²) and plotted against the free moisture content (kg water/kg dry matter) as shown in Fig. 2. (a - e with the order of increasing microwave power settings).

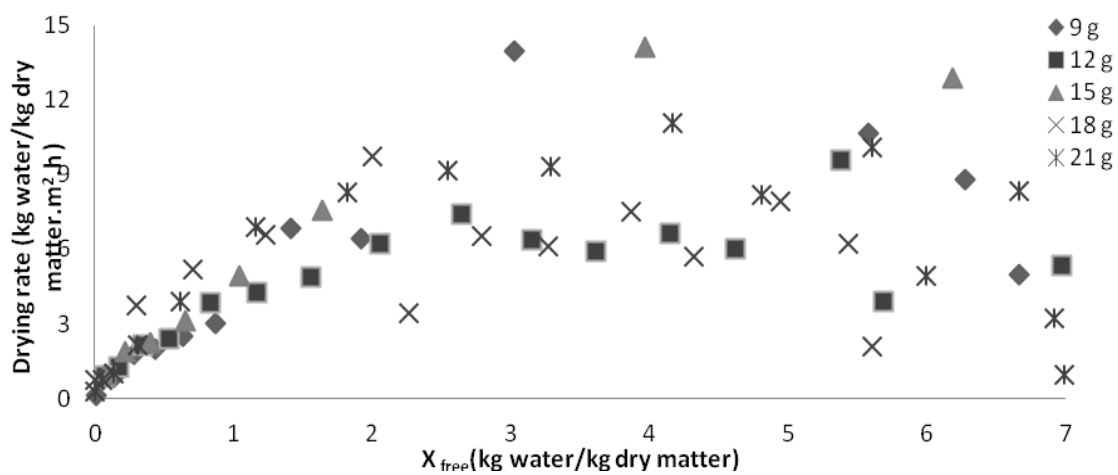




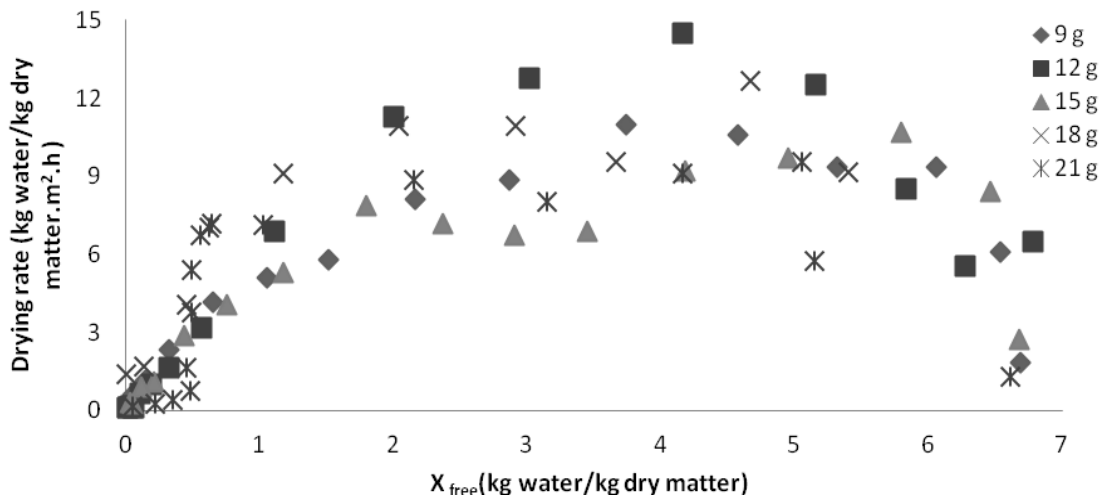
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. 2. The drying rate of red beet puree versus free moisture content at different microwave powers ((a) 180W, (b) 360W, (c) 540W, (d) 720W and (e) 900W)

As can be seen from Fig. 2, the drying rate behavior can be defined to take place in a combined form of constant and falling rate regions. The drying rates significantly increased with the increasing microwave power ($P < 0.05$), however, the dependence on the amount of sample is not clearly defined. At the same time, for all the drying experiments it can be stated that drying takes place mostly in the falling rate period. The higher drying rate of red beet puree was observed at the initial phase of the drying due to the higher moisture diffusion. As the drying progressed, the moisture loss caused a decrease in the absorption of microwave power and resulted in a lower drying rate. This observation is in agreement with previous reports on thin-layer drying of biological products such as apple pomace (Wang et al., 2007a), onion (Demiray et al., 2017), pumpkin (Wang et al., 2007b), and olive pomace (Sadi and Meziane, 2015). The drying rate increased with the increase in microwave output power and the highest values of drying rate were obtained during the experiment at 900W. The higher microwave power resulted in higher rates of evaporation and moisture loss which is related to the drying rate. Therefore, the microwave power level has an important effect on drying rates. It may be due to the high evaporation rate at the higher microwave power settings. Our

results are in agreement with Maskan (2000), Sharma and Prasad, (2006), Alibas -Özkan et al. (2007), Sadi and Meziane (2015), and Demiray et al. (2017). In addition, Maskan, (2000) reported that the higher drying rates observed for products processed by microwaves due to the internal heat generation caused by microwaves establishing a greater vapor pressure difference between the surface and center of the product, thus increasing the product's moisture diffusivity.

It has been accepted that the drying characteristics of biological products in the falling rate period can be described using Fick's diffusion equation (Wang et al., 2007a). The D_{eff} values of microwave dried red beet puree samples placed as a thin layer were calculated from the Fick's diffusion model and the results were given in Table 2.

As can be seen in Table 2, the D_{eff} values generally increased with increasing microwave power settings as expected and only for the samples with the thickness of 6 mm (18g), a decrease of D_{eff} was observed which finally increased to the microwave power of 900 W. Thus, the drying rate can be increased, and the drying time can be shortened by using higher microwave power settings, which increase the D_{eff} values (Sadi and Meziane, 2015). The results are also consistent with Demiray et al. (2017). Where the researchers

reported that this increase may be due to higher heating energy, which would increase the activity of the water molecules leading to higher moisture diffusivity when the samples were dried at higher microwave power settings (Chua et al., 2002). The D_{eff} values of the red beet powder ranged between $1.095E-8$ and $3.438E-6 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ which is in the same range as ($10E-12$ to $10E-6 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$) most foods (Erbay and İcier, 2009). The D_{eff} values of the microwave dried apple pomace (150 – 600 W), okra (180 – 900 W), spinach (180 – 900 W), and onion slices (328, 447, and 557 W) ranged between $1.05E-8$ - $3.69E-8 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Wang et al., 2007a), $2.05E-9$ – $11.91E-9 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Dadali et al., 2007a), $7.6E-11$ – $52.4E-11 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Dadali et al., 2007b), and $2.59E-7$ - $5.08E-7 \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Demiray et al., 2017). The D_{eff} values generally increased

depending on the increasing microwave power settings and sample thickness. But, Süfer et al. (2017) reported that smaller slice thicknesses provided higher D_{eff} values during microwave dehydration. The differences between these two studies are mainly the differences in the food structure. For the samples in the form of puree, the water to be dehydrated is free for movement and in the mechanism of microwave drying more energy is absorbed due to the existence of more water in the increased sample thicknesses. On the other hand, the structure of the onion is compact, and the onion skins behave as a protective layer for moisture removal and for this reason a decrease in thickness of the slices increase the D_{eff} value.

Table 2. The estimated effective moisture diffusivity (D_{eff}), pre-exponential factor (D_0), and activation energy (E_a) values.

Sample Amount (g)	Microwave Power (W)	D_{eff} ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	R^2	D_0 ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	E_a ($\text{W} \cdot \text{g}^{-1}$)	R^2
9	180	1.095E-08	0.991	9.40E-08	77.35	0.942
	360	1.461E-08	0.980			
	540	2.191E-08	0.949			
	720	4.382E-08	0.984			
	900	4.747E-08	0.975			
12	180	1.947E-08	0.983	2.20E-07	65.44	0.977
	360	2.596E-08	0.780			
	540	4.544E-08	0.977			
	720	3.246E-08	0.977			
	900	9.737E-08	0.988			
15	180	3.043E-08	0.977	2.36E-07	24.46	0.999
	360	3.438E-06	0.980			
	540	1.217E-07	0.981			
	720	1.420E-07	0.982			
	900	1.521E-07	0.971			
18	180	4.382E-08	0.972	1.78E-07	14.35	0.895
	360	2.921E-08	0.976			
	540	8.763E-08	0.971			
	720	5.842E-08	0.990			
	900	1.607E-07	0.972			
21	180	1.988E-08	0.976	6.61E-07	28.50	0.935
	360	1.988E-07	0.975			
	540	2.187E-07	0.976			
	720	2.783E-07	0.976			
	900	2.584E-07	0.985			

The activation energy is related to the temperature dependence of any rate operation, however, in microwave heating systems it is not possible to measure exact temperature values (Demiray et al., 2017). For this reason, the modified form of the Arrhenius equation (Eq. 5) was used for calculation of activation energy values which were changing between 14.35 - 77.35 W.g⁻¹ and generally decreased depending on the increase in the amount of the sample. Süfer et al. (2017) reported that the activation energy values of onion slices in two different thicknesses (3 and 7 mm) range between 2.25 - 6.08 W.g⁻¹ for microwave drying. The activation energy of spinach, onion, olive pomace, and corn husk were found to be 9.62 W. g⁻¹ (Dadali et al., 2007b), 7.90 W. g⁻¹ (Demiray et al., 2017), 20.98 W. g⁻¹ (Sadi and Meziane, 2015), and 27.149 W. g⁻¹ (Akdoğan et al., 2017).

In processes where energy is involved, the temperature dependence of the reaction rates (k) is expressed in terms of the Arrhenius equation. In this study, the modified form of the Arrhenius equation (Eq. 6) to relate to the dependence of k on m/P (g.W⁻¹) was used to calculate the activation energy (E_a) and it decreased with the increasing amount of the sample. According to Table 3., The activation energy values ranged between 26.13 and 222.60 W.g⁻¹. When the amount of the sample was kept constant while the microwave power used for the drying operation was changed the k₀ values changed between 4.45E-05 and 1.578E-04 min⁻¹. Where the k₀ values generally increased according to a decreasing amount of sample.

Table 3. The drying rate constant values (k), the pre-exponential constant (k₀), and activation energy (E_a) values.

Sample Amount (g)	Microwave Power (W)	k (min ⁻¹)	R ²	k ₀ (min ⁻¹)	E _a (W.g ⁻¹)	R ²
9	180	2.540E-06	0.999	1.578E-04	222.60	0.832
	360	8.861E-07	0.994			
	540	1.627E-06	0.998			
	720	8.612E-05	0.996			
	900	2.751E-05	0.999			
12	180	8.188E-06	0.999	1.407E-04	166.00	0.869
	360	7.132E-07	0.999			
	540	1.316E-05	0.998			
	720	6.081E-05	0.996			
	900	1.817E-05	0.998			
15	180	2.104E-06	0.992	9.383E-05	47.10	0.836
	360	6.706E-05	0.997			
	540	1.339E-05	0.997			
	720	2.509E-05	0.997			
	900	1.000E-04	0.998			
18	180	2.302E-06	0.996	4.450E-05	29.58	0.999
	360	1.022E-05	0.996			
	540	3.636E-05	0.997			
	720	2.111E-05	0.990			
	900	1.100E-03	0.991			
21	180	3.303E-06	0.989	6.773E-05	26.13	0.985
	360	4.011E-06	0.996			
	540	2.060E-05	0.998			
	720	3.046E-06	0.999			
	900	4.253E-05	0.998			

The results of the energy efficiency of microwave drying

Since drying is a highly energy-intensive process (due to the latent heat of evaporation required), it is important that the drying should be energy efficient (Varith et al., 2007). For this reason, energy efficiency and product quality have been identified as the key factors of research in drying studies. The energy consumption of the microwave oven at five different microwave power settings (expressed per unit amount of samples) ranged between 0.0094 and 0.0125 kWh.g⁻¹. The energy consumption increased according to the increasing microwave power settings and amount of sample due to longer

drying times at the higher amount of sample and high energy consumption at high microwave power settings. Similar results were obtained by Alibas-Özkan et al. (2007). The researchers reported that the energy consumption of the microwave oven during the drying of spinach leaves at eight different microwave power settings (90 - 1000W) ranged between 0.16 and 0.26 kWh and the energy consumption at low microwave power levels yielded longer drying periods.

The MER and SEC values of the different amounts of red beet puree under various conditions of the microwave drying process are presented in Fig. 3.

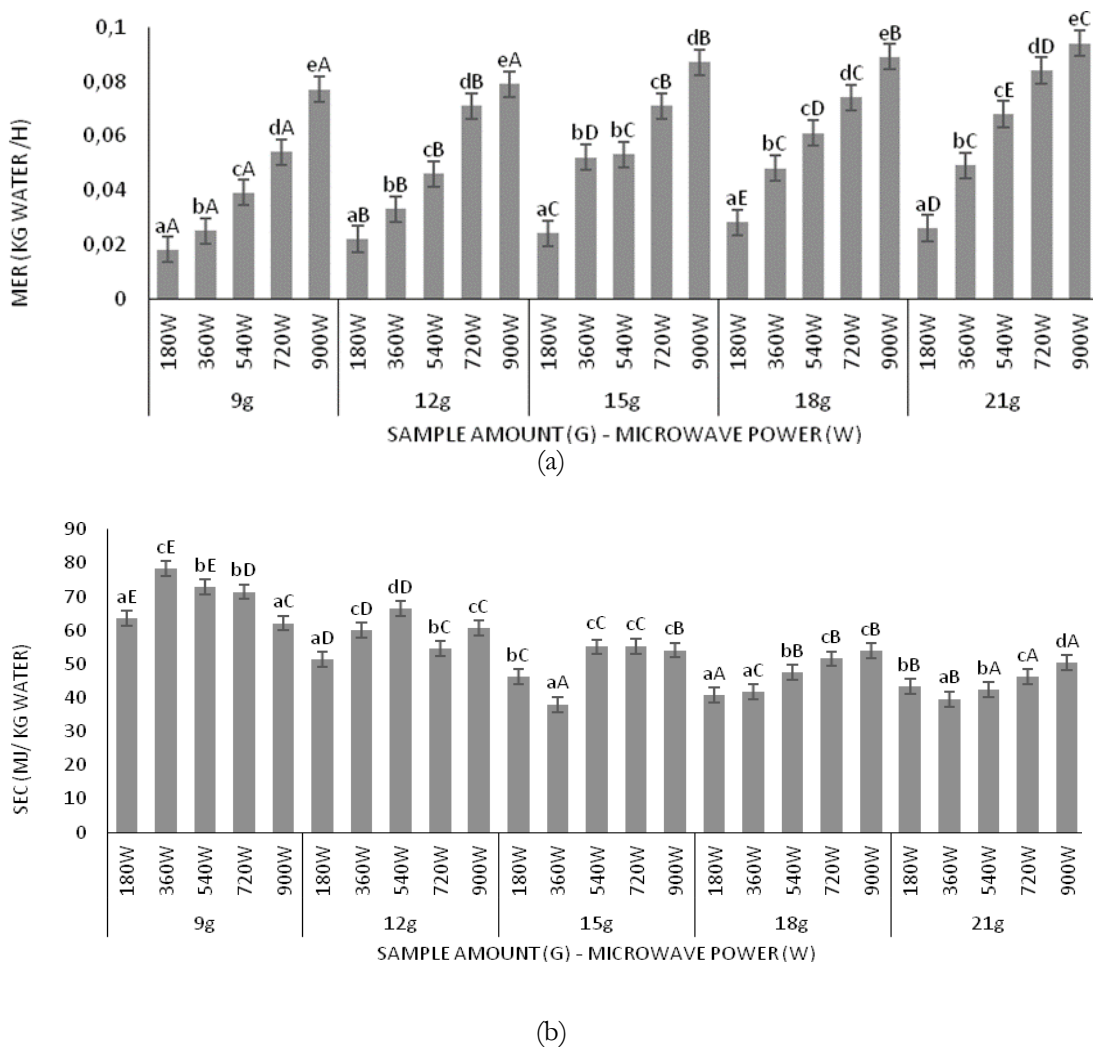


Fig. 3. MER (a), and SEC (b) values (a - e; shows significant difference between the microwave power settings and A - E shows significant difference between the sample amount)

According to Fig 3, when the amount of sample is kept constant, the MER values of the samples generally increased depending on the increasing microwave power settings ($P < 0.05$). It may be due to the quick absorption of energy of the water molecules at higher microwave power settings which caused the rapid evaporation of water. In this way, the total drying time decreased, and the MER values increased. At the same microwave power setting, the MER value generally increased depending on the increasing amount of sample ($P < 0.05$). It may be due to a higher amount of evaporated water at the higher sample amounts. The thermal efficiency of a dryer is commonly defined in terms of its specific energy consumption (SEC) which indicates the quantity of heat required to evaporate a unit mass of water. The analysis of specific energy consumption during the applied microwave energy on the heating and drying processes has been investigated in many studies such as garlic cloves (Sharma and Prasad, 2006), peeled longan (Varith et al., 2007), and olive pomace (Sadi and Meziane, 2015). An increase in the amount of sample generally resulted in a decrease in the SEC values except for the 15g sample amount ($p < 0.05$). When the amount of sample increased, the amount of water to be removed increased and as a result, the SEC value decreased. In addition, generally the lower moisture contents of a higher amount of dried samples which indicated the higher amount of evaporated water may also be the reason for the lower SEC values. In this study, the SEC values ranged between 37.98 and 78.43 MJ.kg⁻¹water. These values are in a comparable range with the values obtained during the drying of olive pomace (25.32 - 52.56 MJ.kg⁻¹water) (Sadi and Meziane, 2015). Sharma and Prasad, (2006), studied the microwave-convective drying (10 - 40W microwave power, 40 - 70°C drying air temperature and 1 and 2 m. s⁻¹ air velocity) of garlic cloves and reported that the microwave drying reduced the energy consumption due to the volumetric heating effect which causes a lower drying time. Baker and McKenzie, (2005), reported that the highly efficient dryers are characterized by lower SEC values. In this study, the lower SEC values were obtained at a 180 and 360W microwave power setting compared to

other microwave power settings due to lower energy consumption, but in any case, when these values are to be used in efficiency evaluations the results should be considered together with drying data.

The results of the physical analyses

The moisture content and water activity values of the powders ranged between 2.48 and 7.38% (wb), and 0.172 and 0.447, respectively (Table 4). Results showed that the moisture content and water activity values of the red beet powders generally decreased with increasing microwave power settings and increased with an increasing amount of sample ($P < 0.05$). The high microwave power increases the driving force of mass transfer and accelerates the rate of water vapor diffusion and may result in a lower moisture content and water activity of the red beet powders. The values of water activity under 0.6 is generally considered as microbiologically stable (Quek et al., 2007) and at 0.20 and 0.40 ensure the stability of the product against browning and hydrolytic reactions, lipid oxidation, auto-oxidation, and enzymatic activity (Marques et al., 2007). The measured water activity values of red beet powders are within acceptable limits for the safe storage of the products. The lowest moisture content values and the lowest water activity values were obtained from the samples which were dried at 900W. The color values of the fresh red beet and microwave dried red beet powders are given in Table 4. According to the results, significant differences were observed between the red beet puree and the red beet powders ($P < 0.05$). Results showed that the increase of microwave power settings caused a generally significant increase in the L*, a*, ΔE, Chroma, and BI values of the red beet powders ($P < 0.05$). At the higher microwave power settings, the degradation of the pigments or browning reactions are higher, and these may be related to the pigment destruction and may cause higher ΔE and BI values.

CONCLUSION

In this study, red beet powders were obtained using a microwave drying technique. The obtained powders will provide different application areas in addition to possible use of red

beets outside of the production season and easy storage and transportation properties. Generally, the moisture content of the powders decreased with the increase of microwave power (2.60% at 900W and 5.40% at 180W on the average). On the evaluation of the seven thin layer drying models by comparing the R², χ^2 , and RMSE, the Page model gave an excellent fitting to the drying data of the red beet puree. The drying time of the sample which has the highest amount of mass (21 gram) significantly decreases from the 2100s (180W) to 600s (900W) with an increase in the microwave power (P<0.05). The drying rate generally increased with the increase in microwave output power and the average drying

rate values significantly increased from 2.08 kg water/kg dry matter.m².h (180W) to 14.50 kg water/kg dry matter.m².h (900W) with an increase in the microwave power setting (P<0.05). The k₀ values increased and D₀ values decreased generally according to the decreasing amount of the sample. The calculated MER values increased with the amount of sample and microwave power setting and the highest values ranged between 0.017 to 0.094 kg water.h⁻¹. Our results showed that increasing the microwave power setting caused a significant increase in the L*, a*, ΔE, Chroma, and BI values of the red beet powders (P<0.05).

Table 4. The moisture content, water activity, and color values of red beet puree and the powders

Sample	Microwave Power (W)	Moisture content (wb,%)	Water activity	Color Values						
				L*	a*	b*	ΔE	Chroma	BI	
Fresh Puree	-	80.01±0.01	0.999±0.00	14.89±0.30	16.43±0.14	3.94±0.17	-	14.96±0.14	-	
Microwave Dried Red Beet Powder Sample Mass (g)	9	180	7.38±0.02 ^{ew}	0.447±0.005 ^{et}	29.96±0.05 ^{aw}	16.63±0.05 ^{aw}	2.10±0.13 ^{at}	15.18±0.25 ^{aw}	16.76±0.32 ^{aw}	44.05±0.45 ^{aw}
		360	4.95±0.05 ^{es}	0.265±0.010 ^{et}	30.74±0.10 ^{bw}	17.63±0.10 ^{bw}	2.02±0.45 ^{aw}	16.01±0.18 ^{bx}	17.74±0.40 ^{bw}	44.64±0.12 ^{ax}
		540	3.33±0.02 ^{bs}	0.230±0.006 ^{bt}	35.94±0.19 ^{dx}	18.53±0.12 ^{cw}	4.14±0.05 ^{ew}	21.16±0.21 ^{cx}	19.08±0.50 ^{bw}	47.07±0.20 ^{bw}
		720	4.84±0.09 ^{dw}	0.292±0.006 ^{dt}	34.17±0.14 ^{es}	19.53±0.10 ^{dw}	3.58±0.05 ^{bx}	19.54±0.45 ^{cx}	19.95±0.23 ^{cw}	49.24±0.12 ^{dx}
		900	2.56±0.01 ^{at}	0.203±0.013 ^{at}	40.12±0.05 ^{ey}	21.63±0.18 ^{ew}	5.07±0.26 ^{dw}	25.60±0.31 ^{dy}	21.24±0.24 ^{cw}	48.12±0.22 ^{ct}
	12	180	5.39±0.44 ^{dt}	0.356±0.035 ^{bt}	32.79±0.27 ^{aw}	16.63±0.63 ^{aw}	3.56±0.24 ^{ct}	17.90±0.13 ^{aw}	17.00±0.25 ^{aw}	45.59±0.21 ^{cw}
		360	3.73±0.17 ^{cw}	0.268±0.106 ^{at}	32.57±0.23 ^{ax}	17.63±0.13 ^{bw}	1.81±0.20 ^{aw}	17.84±0.20 ^{ay}	17.72±0.19 ^{bw}	41.58±0.28 ^{aw}
		540	3.99±0.36 ^{ey}	0.338±0.037 ^{bs}	35.47±0.42 ^{bx}	18.79±0.10 ^{cw}	6.09±0.15 ^{dt}	20.81±0.16 ^{bx}	19.60±0.45 ^{cw}	54.40±0.27 ^{ey}
		720	2.96±0.13 ^{bt}	0.312±0.061 ^{bt}	37.62±0.16 ^{ey}	19.68±0.09 ^{dw}	2.82±0.11 ^{bw}	22.98±0.24 ^{ez}	19.83±0.19 ^{cw}	42.57±0.13 ^{bt}
		900	2.59±0.19 ^{at}	0.250±0.010 ^{at}	35.09±0.09 ^{bw}	20.63±0.17 ^{cw}	3.12±0.12 ^{ct}	20.64±0.22 ^{bt}	20.86±0.35 ^{dt}	48.20±0.24 ^{dt}
	15	180	5.36±0.08 ^{bt}	0.350±0.022 ^{ct}	26.53±0.07 ^{at}	16.63±1.13 ^{aw}	2.43±0.05 ^{cw}	11.73±0.15 ^{at}	16.81±0.24 ^{aw}	50.82±0.22 ^{bx}
		360	2.96±0.10 ^{at}	0.343±0.081 ^{ct}	27.65±0.12 ^{bt}	17.63±0.20 ^{bw}	2.31±0.07 ^{bx}	12.92±0.24 ^{bt}	17.78±0.32 ^{bw}	50.51±0.27 ^{by}
		540	3.03±0.06 ^{aw}	0.340±0.082 ^{cs}	29.02±0.13 ^{ct}	18.93±0.16 ^{cw}	5.48±0.25 ^{dy}	14.37±0.23 ^{ct}	19.42±0.24 ^{cw}	63.74±0.28 ^{dz}
		720	2.97±0.34 ^{at}	0.253±0.092 ^{bt}	31.90±0.07 ^{dt}	19.63±0.16 ^{dw}	1.05±0.06 ^{at}	17.54±0.32 ^{dt}	19.65±0.29 ^{cw}	43.46±0.37 ^{aw}
		900	2.74±0.06 ^{aw}	0.188±0.090 ^{at}	33.76±0.32 ^{ct}	20.73±0.25 ^{cw}	5.46±0.15 ^{dw}	19.39±0.27 ^{ct}	21.34±0.36 ^{dt}	58.37±0.25 ^{cx}
	18	180	5.37±0.21 ^{dt}	0.348±0.061 ^{bt}	33.86±0.18 ^{ey}	11.43±0.24 ^{at}	3.12±0.12 ^{bx}	19.63±0.29 ^{by}	11.85±0.40 ^{at}	32.89±0.38 ^{bt}
		360	3.90±0.08 ^{ct}	0.345±0.090 ^{bt}	33.54±0.06 ^{by}	16.60±0.12 ^{ct}	1.15±0.05 ^{at}	18.85±0.24 ^{az}	16.64±0.27 ^{dt}	36.41±0.34 ^{ct}
		540	3.22±0.12 ^{bw}	0.340±0.094 ^{bs}	34.63±0.06 ^{cw}	14.67±0.19 ^{bt}	1.20±0.23 ^{at}	20.00±0.28 ^{bw}	14.72±0.32 ^{bt}	32.04±0.12 ^{at}
		720	3.01±0.13 ^{bt}	0.327±0.101 ^{bt}	35.31±0.13 ^{dx}	14.69±0.16 ^{bt}	5.20±0.21 ^{cz}	20.53±0.28 ^{cy}	15.58±0.30 ^{ct}	44.44±0.35 ^{dw}
		900	2.48±0.12 ^{at}	0.187±0.032 ^{at}	39.50±0.46 ^{ey}	18.23±0.13 ^{dt}	8.47±0.16 ^{dy}	25.08±0.34 ^{dy}	20.10±0.47 ^{ct}	55.89±0.43 ^{cw}
21	180	5.20±0.13 ^{ct}	0.387±0.036 ^{ct}	29.96±0.06 ^{aw}	16.63±0.16 ^{aw}	2.94±0.34 ^{ax}	15.10±0.24 ^{az}	16.80±0.35 ^{aw}	47.31±0.27 ^{ay}	
	360	3.06±0.09 ^{bt}	0.268±0.021 ^{bt}	30.79±0.24 ^{bw}	17.63±0.03 ^{bw}	4.12±0.37 ^{by}	15.40±0.26 ^{aw}	18.11±0.36 ^{bw}	52.61±0.42 ^{dz}	
	540	2.62±0.03 ^{at}	0.258±0.095 ^{bw}	34.42±0.26 ^{dw}	18.63±0.22 ^{cw}	4.50±0.18 ^{bx}	19.66±0.26 ^{cw}	19.17±0.24 ^{cw}	50.33±0.30 ^{bx}	
	720	2.73±0.36 ^{at}	0.266±0.052 ^{bt}	32.97±0.13 ^{cw}	19.50±0.23 ^{dw}	3.80±0.09 ^{by}	18.36±0.35 ^{bw}	19.99±0.26 ^{dw}	51.73±0.28 ^{cy}	
	900	2.63±0.06 ^{aw}	0.172±0.020 ^{at}	37.01±0.18 ^{ex}	20.89±0.28 ^{cw}	7.36±0.33 ^c	22.77±0.30 ^{dw}	21.90±0.34 ^{cw}	59.86±0.40 ^{ey}	

Different letters (a–e) in the same column indicate significant difference between the microwave powers P < 0.05.

Different letters (t–z) in the same column indicate significant difference between the amounts of samples at P < 0.05.

REFERENCES

- 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. (2007). Energy consumption and colour characteristics of nettle leaves during microwave vacuum and convective drying. *Biosystems Eng*, 96(4):495-502.
- Alibas, I. (2006). Characteristics of chard leaves during microwave convective and combined microwave convective drying. *Drying Tech*, 24(1):1425- 1435.
- Alibas-Özkan, I., Akbudak, B., Akbudak, N. (2007). Microwave drying characteristics of spinach. *J Food Eng*, 78:577-583.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis. 17th ed. Gaithersburg. MD. USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Baker, C.G.J., McKenzie, K.A. (2005). Energy Consumption of Industrial Spray Dryers. *Drying Technol*, 23:365-386.
- Bazaria, B., Kumar, P. (2018). Optimization of spray drying parameters for beetroot juice powder using response surface methodology (RSM). *J Saudi Soc Agric Sci*, 14(4); 408-415.
- Celma, A., Rojas, S., Lopez-Rodríguez, F. (2008). Mathematical modelling of thin-layer infrared drying of wet olive husk. *Ch. Eng. and Processing: Process Intensification*, 47: 1810-1818.
- Chua, K.J., Chou, S.K., Ho, J.C., Hawlader, M.N.A. (2002). Heat pump drying recent developments and future trends. *Drying Technol*, 20 (8): 1580-1600.
- Crank, J. (1975). The Mathematics of Diffusion. 2nd ed. Oxford (UK): Clarendon Press.
- Çalışkan, G., Dirim, S.N. (2013). The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin added during the spray drying of sumac extract. *Food Bioprod Process*, 91 539–548.
- Dadali, G., Kılıc-Apar, D., Ozbek, B. (2007a). Estimation of effective moisture diffusivity of okra for microwave drying. *Drying Technol*, 25:1445–1450.
- Dadali, G., Demirhan, E., Ozbek, B. (2007b). Microwave Heat Treatment of Spinach: Drying Kinetics and Effective Moisture Diffusivity. *Drying Technol*, 25: 1703–1712.
- 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.
- Demirhan, E., Ozbek, B. (2011). Colour change kinetics of celery leaves undergoing microwave drying. *Chem Eng Commun*, 198(10):1189-1205.
- Doymaz, İ. (2004). Convective air-drying characteristics of thin layer carrots. *J Food Eng*, 61: 359–364.
- Doymaz, İ. (2006). Thin-layer drying behaviour of mint leaves. *J Food Eng*, 74: 370–375.
- 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.
- Ergün, K., Çalışkan, G., Dirim, S.N. (2016). Determination of the drying and rehydration kinetics of freeze-dried kiwi (*Actinidia deliciosa*) slices. *Heat Mass Transfer*, 52:2697-2705.
- Ertekin, C., Yaldiz, O. (2004). Drying of eggplant and selection of a suitable thin layer drying model. *J Food Eng*, 63:349-359.
- Gökhlae, S.V., Lele, S.S. (2011). Dehydration of Red Beet Root (*Beta vulgaris*) by Hot Air Drying: Process Optimization and Mathematical Modeling. *Food Sci Biotechnol*, 20(4): 955-964.
- Jaya, S., Das, H. (2007). Modelling for vacuum drying characteristics of coconut presscake. *J Food Eng*, 79:92-99.
- Jindarat, W., Rattanadecho, P., Vongpradubchai, S. (2011). Analysis of energy consumption in microwave and convective drying process of multi-layered porous material inside a rectangular wave guide, *Exp Thermal Fluid Sci*, 35: 728-737.

- Kaleta, A., Gornicki, K. (2010). Some remarks on evaluation of drying models of red beet particles. *Energy Convers Manag*, 51: 2967-2978.
- Koul, V. K., Jain, M.P., Koul, S., Sharma, V.K., Tikoo, C.L., Jain, S.M. (2002). Spray drying of red beet root juice using different carries. *Indian J Ch Tech*, 9: 442-445.
- Lejeune, B., Arvouet- Grand, A., Pourat, A. (1991). Dietary use of red beet crushable² tablets of freeze-dried red beet pulp. *Drug Dev Ind Pharm*, 17(7): 931-934.
- López, N., Puértolas, E.P., Condón, S., Raso, J., Alvarez, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beet root by pulsed electric fields. *J Food Eng*, 90:60–66.
- Marques, L. G., Ferreira, M. C., Freire, J. T. (2007) Freeze-drying of acerola (*Malpighia glabra* L.). *Chem Eng Prog*, 46: 451–457.
- Maskan, M. (2001), Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying. *J Food Eng*, 48:169–175.
- Maskan, M. (2000). Microwave/air and microwave finish drying of banana. *J Food Eng*, 44:71–78.
- Obón, J.M, Castellar, M.R., Alacid, M., Fernández-López, J.A. (2009). Production of a red purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. *J Food Eng*, 90:471–479.
- Özbek, B., Dadali G. (2007). Thin-layer drying characteristics and modelling of mint leaves undergoing microwave treatment. *J Food Eng*, 83:541–549.
- Pathare, P.B., Opara, L.U., Al-Said, F.A. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Tech*, 6(1):36-60.
- Quek, Y.S., Chok, N.K. and Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chem Eng Prog*, 46: 386-392.
- Sadi, T., Meziane, S. (2015). Mathematical modelling, moisture diffusion and specific energy consumption of thin layer microwave drying of olive pomace. *Int Food Res J*, 22(2): 494-501.
- Sharma, G.P., Prasad, S. (2006). Specific energy consumption in microwave drying of garlic cloves. *Energy*, 31:1921-1926.
- Singh, S., Gaikwad, G., Omre, P.K., Kumbhar, B.K. (2013). Microwave Convection Drying Characteristics of Beet Root (*Beta Vulgaris* L.) Using Modeling Equations for Drying. *J. Food Process Tech*.4-9.
- Süfer, Ö., Sezer, S., Demir, H. (2017). Thin layer mathematical modeling of convective, vacuum and microwave drying of intact and brined onion slices, *J Food Process Preserv*, 41(6):1-13.
- Toğrul, H. (2006). Suitable drying model for infrared drying of carrot. *J Food Eng*, 77: 610-619.
- Varith, J., Dijkanarukkul, P., Achariyaviriya, A., Achariyaviriya, S. (2007). Combined microwave-hot air drying of peeled longan. *J Food Eng*, 31:45-46.
- Wang, Z., Sun, J., Chan, F., Liao, X., Hu, X. (2007a). Mathematical modelling on thin layer microwave drying of apple pomace with and without hot air pre-drying. *J Food Eng*, 80:536–544.
- Wang, J., Wang, J. S., Yu, Y. (2007b). Microwave drying characteristics and dried quality of pumpkin. *Int J Food Sci Tech*, 42: 148-156.

DETERMINATION OF AFLATOXIN CONTENTS OF SEBINKARAHISAR WALNUT VARIETY BY ELISA METHOD

Mustafa Cüce*

¹Department of Food Technology, Şebinkarahisar School of Applied Sciences, Giresun University, Giresun, Turkey

Received / Geliş: 13.02.2019; Accepted / Kabul: 15.07.2019 Published online / Online baskı: 24.07.2019

Cuce, M. (2019). Determination of aflatoxin contents of Şebinkarahisar walnut variety by ELISA method. GIDA (2019) 44 (4): 672-680 doi: 10.15237/gida.GD19042

Cüce, M. (2019). Şebinkarahisar ceviz çeşidinde aflatoksin içeriğinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi. GIDA (2019) 44 (4): 672-680 doi: 10.15237/gida.GD19042

ABSTRACT

Aflatoxins are carcinogenic toxic metabolites for human foods and animal feeds in terms of pharmaceutical produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. This study was carried out to determine the aflatoxin changes in Şebinkarahisar walnut under different seasonal changes between the years by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The presence of aflatoxin was found in all of the samples within measurable limits. But in none of the total 20 different walnut samples examined, aflatoxin was not observed above the limits determined by the Turkish Food Codex Contaminants Regulation. Each treatment included 3 wells were carried out triplicates to determination of AFT and AFB1 and correlation analysis showed a significant relationship between AFB1 and AFT for 2 different years. In addition, although there was an increase in aflatoxin content due to seasonal changes between the years, there was no statistically significant difference and it was supported by correlation analysis.

Keywords: Aflatoxin, *Aspergillus flavus*, seasonal changes, walnut, ELISA

ŞEBINKARAHİSAR CEVİZ ÇEŞİDİNDE AFLATOKSİN İÇERİĞİNİN ELISA YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

ÖZ

Aflatoksinler, özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen farmasötik olarak insan yiyecekleri ve hayvan yemleri için kanserojen toksik metabolitlerdir. Bu çalışma, yıllar arasındaki mevsimsel değişimlere bağlı olarak Şebinkarahisar'da yetişen ceviz çeşidindeki aflatoksin miktarındaki değişimi enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) yöntemi ile belirlemek amacıyla yapılmıştır. Tüm örneklerde aflatoksin varlığı ölçülebilir limitler dahilinde bulunmuştur. Ancak incelenen toplam 20 farklı ceviz numunesinin hiçbirinde, aflatoksin, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği tarafından belirlenen sınırların üstünde gözlenmemiştir. Her bir deneme örnek başına 3 kuyucuk içerecek şekilde 3 tekrarlı yapılmıştır ve korelasyon analizi 2 farklı yıl boyunca AFB1 ve AFT arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ek olarak, her ne kadar yıllar arasındaki mevsimsel değişimlere bağlı olarak aflatoksin içeriğinde artışlar görülsede istatistiksel anlamda bir fark oluşmamıştır ve bu durum korelasyon analizi ile desteklenmiştir.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin, *Aspergillus flavus*, mevsimsel değişiklikler, ceviz, ELISA

* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ mustafacuce@windowslive.com

☎ (+90) 537 346 86 81

☎ (+90) 454 310 17 17

INTRODUCTION

Mycotoxins, mostly produced by *Aspergillus* species, are considered to be very important natural toxins because moulds can be found almost everywhere and can develop their toxins in many foodstuffs and animal feeds from the field until consumed (Pohland, 1993; Shukla, 2016). These microorganisms generate various types of toxic metabolites and the major ones known as aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1) and aflatoxin (AFG2) (Chun et al., 2007; Shukla, 2016). These four aflatoxin groups were classified as group 1 carcinogens by the international agency for research on cancer (IARC, 1993). Among these metabolites, AFB1 is considered to be the most hazardous group and is often detected in combination with total aflatoxin (AFT) (Moss, 1998). These natural metabolites have carcinogenic, mutagenic, teratogenic and immuno-suppressive effects on certain doses and can be found in walnut, nut, peanut, spices, cereals, dried fruit varieties and foodstuff made from these products and other many commodities associated with human nutrition and animal feed (Leszczyńska et al., 2001; Park et al., 2004; Castells et al., 2008; Erkmen and Bozoglu, 2008a). According to the 2013 FAO data, Turkey ranks fourth in walnut production. (Anonymous, 2013a; Anonymous, 2015b). In this production, Şebinkarahisar has an important place due to its climate characteristics. Variety of Şebinkarahisar walnut, named after the region and registered in 1993, is preferred by many producers and consumers in our country due to the late foliage tolerance to late spring frosts, enough fruit in the side branches, at least 2-4 fruit in the bunch, thin crust, easy and complete removal of the inner, light coloured, low inner shrinkage and high total fatty acids ratio (Karadeniz and Şişman, 2015). Due to their high biological content, the Şebinkarahisar walnut variety is preferred primarily as dry food as well as being used in many areas of the food industry, especially by baklava producers in Gaziantep.

In recent years, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are frequently preferred by researchers to determine toxic metabolites

formed in foods due to high temperature, humidity and other storage conditions. Climate change influences the growth of the fungi producing the mycotoxins in commodities (IPPC, 2007). Several studies have been reported on mycotoxigenic fungal infection and contamination with mycotoxins in foods due to climate changes (Paterson and Lima, 2011; Magan et al., 2011; Wu et al., 2011) Again in 2003 and 2004, it was reported that a high percentage of *A. flavus* occurred due to climatic changes in maize used as animal feed in Italy (EU ETS, 2003).

ELISA method have advantages over other methods of aflatoxin detection due to its properties such as low cost, simplicity, the use of safe reagents, determination of contaminant in a large number of samples in a shorter time, and high precision results (Chun et al., 2007; Reza et al., 2012). In Turkey, the upper limit of aflatoxin acceptable for walnut according to the Turkish Food Codex is 8 µg/kg for AFB1 and 15 µg/kg for AFT (TGK, 2011). However, this ratio is considered as 5 µg /kg for AFB1 and 10 µg/kg for AFT according to European Union criteria (EC, 2006).

Nuts and their products have an important role in our daily diet as well as part of the ingredient. So it is important to control their level of aflatoxin occurrence in food. As a result of increasing food safety demand, it is essential to determine the aflatoxin contents of walnut species produced in Şebinkarahisar according to the seasonal changes. This report was designed to detect the AFT and AFB1 ratios of walnut variety produced in the seasonal changes of Şebinkarahisar in 2016 and 2017.

MATERIALS AND METHODS

Samples Collection

The walnut samples of the years 2016 and 2017 were collected from producers from different points of Şebinkarahisar in September-October which is the walnut harvest time for Şebinkarahisar (Table 1). Samples, taken from different points, were placed in plastic containers and the point of receipt was labelled. Samples were transferred to the laboratory and stored in

laboratory conditions (room temperature) as shelled until analysis. Samples were analyzed one month later.

Table 1. Location of walnut variety collected from different points of Şebinkarahisar, Giresun

Variety Name	Locality Information
Şebin T1	Tamzara District 20.x.2016-2017, N 40 19'35.24" E 038 26'26.45", 1254 m
Şebin K1	Kırkgöz District 21.x.2016-2017, N 40 17'14.26" E 38 27'09.26", 1093 m
Şebin K2	Kırkgöz District 21.x.2016-2017, N 40 17'14.37" E 38 27'10.35", 1092 m
Şebin K3	Kırkgöz District 21.x.2016-2017, N 40 17'15.10" E 38 27'07.11", 1095 m
Şebin Y1	Yıldıriç Village 21.x.2016-2017, N 40 18'28.31" E 38 29'40.31", 1218 m
Şebin Y2	Yedikardeş Village 12.x.2016-2017, N 40 16'47.57" E 38 15'22.71", 1169 m
Şebin Y3	Yedikardeş Village 12.x.2016-2017, N 40 16'47.05" E 38 15'22.95", 1166 m
Şebin E1	Yedikardeş Village 12.x.2016-2017, N 40 20'28.32" E 38 19'54.63", 1565 m
Şebin B1	Biroğul District 10.x.2016-2017, N 40 17' 11.40" E 38 27'47.74", 1028 m
Şebin A1	Avutmuş District 11.x.2016-2017, N 40 18'44.35" E 38 25'17.05", 1034 m
Şebin O1	Ovacık Village 11.x.2016-2017, N 40 19' 20.04" E 38 21'55.78", 1671 m
Şebin C1	Ovacık Village 10.x.2016-2017, N 40 18' 29.02" E 38 20' 04.74", 1404 m
Şebin K4	Kütüküt District 16.x.2016-2017, N 40 18' 14.28" E 38 27' 01.87", 1105 m
Şebin A2	Kütüküt District 24.x.2016-2017, N 40 21' 57.42" E 38 35' 25.42", 1603m
Şebin T1	Toplukonak Village 20.x.2016-2017, N 40 21' 48.44" E 38 35' 02.44", 1606 m
Şebin G1	Gürpınar Village 23.x.2016-2017, N 40 22'30.54" E 38 33'02.48", 1693 m
Şebin T2	Turpçu Village 24.x.2016-2017, N 40 19' 43.59" E 38 34' 51.74", 1360 m
Şebin K5	Kavaklar District 24.x.2016-2017, N 40 17'27.27" E 38 27'24.12", 1215 m
Şebin K6	Konak Village 14.x.2016-2017, N 40 21'30.13" E 38 32'13.39", 1447 m
Şebin C2	Konak Village 14.x.2016-2017, N 40 20'21.36" E 38 30'39.39", 1141 m

x = October, N = North, E = East, m = meter

Extraction Procedure

5 grams of each walnut sample taken from different points were individually weighed and taken to separate filter bags both for AFT and aflatoxin B1. 25 mL of 80:20 methanol:water (v:v) mixture was added via macropipette onto the each sample. All samples were then disintegrated with the fully automatic CLS-400D Stomacher mixer for 5 min. The liquid fraction was filtered through whatman cellulose filter paper. 1 mL aliquot of the extract was taken with the help of the micropipette and diluted 9 mL of 80:20 methanol:water (v:v) mixture and stored at +4 °C until further analysis. In the latter case, the ratio of sample to extraction solvent is 1:50 (w/v). For the determination of both AFT and AFB1 three

different extract was prepared and each experiment was repeated as triplicates

Reagents and Tests

Total Aflatoxin

The AFT test kit contains the following components: 96 wells (12 x 8 well strips) in a microwell holder coated with mouse anti-aflatoxin monoclonal antibodies; 96 non-coated wells in a microwell holder for the mixing wells. Standard solutions of AFT are at the following concentrations: 0.0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 ng/mL in 50:50 methanol:water (v:v) mixture. In addition to the standards a 12 ml HRP conjugate of peroxidase in a buffer; 2 x 12 mL proprietary sample diluent; a unit of stabilized

tetramethylbenzidine substrate reagent solution; an acidic reagent for termination process; a phosphate buffered saline for washing process (PBS 0.1 mol/dm³, pH 7.4, 0.05%, Tween 20).

Aflatoxin B1

A set of AFB1 kit consists of 96 wells (12 x 8 well strips) in a microwell holder coated with antibodies to aflatoxin; 1 set of 12 x 8 non-coated mixing wells consisting of 96 pieces. Standard solutions of AFB1 are at the following concentrations: 0.0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 ng/mL in 50:50 methanol:water (v:v) mixture. In addition to the standards a 12 ml HRP conjugate of peroxidase in a buffer; 2 x 12 mL proprietary sample diluent; a unit of stabilized tetramethylbenzidine substrate reagent solution; an acidic reagent for termination process; a buffer for washing (PBS 0.1 mol/dm³, pH 7.4 0.05%, Tween 20). ELISA method was used in this study. AFT and AFB1 values were determined by Helica test kits (Helica Biosystems Inc. USA).

Apparatus and Equipment

Samples of walnut were weighed with DENVER SI-234 analytical balance (Germany). The samples were homogeneously smashed in methanol with a fully automated CLS-400D Stomacher mixer (USA). Multi-purpose sterile Pasteur pipettes and micropipettes with various volumes were also used for the insertion of standards and extracts into the wells (Germany). The plates were washed using a special washing machine Biotech Elx50 (Biotek Instruments INC, USA). Finally, absorbances of the examined and standard solutions were measured by Biotech ELx808 reading apparatus for ELISA tests (Biotek Instruments INC, USA).

Experiment

First of all, mixing wells were prepared according to the standard and sample number from the mixing wells in the kit. 200 µL of dilution solution were added to each of these mixing wells prepared. Then 100 µL of the standards and prepared extracts in the kit are added separately to each well. The mixture in the well is thoroughly homogenized by means of micropipette. 100 µL of this diluted mixture was transferred to the

antibody-coated well and allowed to incubate for 30 min at room temperature in the darkness. The wells were washed 3 times with the fully automatic Biotech Elx50 strip washer with PBS. Washed wells were inverted in case of a drop of water. 100 µL of HRP conjugate was added to each well and allowed to incubate again in the dark for 30 min.

After the conjugate application, the above-mentioned washing was repeated and 100 µL of substrate was added and allowed to incubate for 10 min. After the incubation period, color changes in the wells were evaluated according to standards. Finally, 100 µL of stop solution was added to each well and readings were performed with Biotech ELx808 reading apparatus for ELISA tests within 15 min at the latest. This procedure was performed three times for both AFT and AFB1, separately. The content of aflatoxins was evaluated using the previously prepared standard curve.

Collection of Climate Data

All climate data of Şebinkarahisar in 2016 and 2017 were recorded in T.C. the General Directorate of Meteorology of the Ministry of Agriculture and Forestry was obtained from Giresun Meteorology Station Directorate.

Statistical Analysis

Each treatment included 3 wells were carried out triplicates to determination of AFT and AFB1. All data were conducted with SPSS Statistics program (SPSS 21.0) by using analysis of variance (ANOVA) with Pearson's correlation. Pearson correlation was preferred because all of the data did not conform to normal distribution. Correlations analyses were carried according to Spearman method (Spearman, 1904).

RESULTS

Determination of Aflatoxin Content

In the ELISA method, it is easier to process than the other methods because there is no need for the processes such as isolation and purification of the component to be tested. In addition, the preparation process consists of the only extraction. In the present report, AFT and AFB1 contents of walnut samples grown in

Şebinkarahisar in 2016-2017 years were determined. The effects of annual climatic changes on the aflatoxin content in walnut growing in the Şebinkarahisar region were investigated. The mean temperature, humidity and precipitation rates were analyzed for the changes in aflatoxin content over the years. Humidity of the most important parameters affecting aflatoxin content in foods was calculated to be higher in 2016 (Table 2). Therefore, AFT and AFB1 ratios were higher in all samples examined in 2016. The highest AFT ratio was determined in the Kırkgöz III sample which is accepted as the origin of Şebinkarahisar walnut variety with $0.845 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{kg}$. Surprisingly, the highest total aflatoxin ratio was obtained in the sample taken from the same location in 2017

samples with $0.828 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{kg}$. However, these calculated rates are not above the standards determined by the Turkish food codex. It is estimated that a decrease of 6.15% in humidity in 2017 resulted in a 2.01% decrease in the total aflatoxin ratio compared to 2016. Similar to AFT, the highest AFB1 ratios were obtained from 2016 data. Walnut samples taken from the Çiftlik region gave the highest AFB1 ratio with 0.630 ± 0.01 (Table 2). Although it was determined that all values obtained from the samples of 2016 increased significantly compared to the values obtained from the samples of 2017, it was determined that these values were acceptable according to the regulations of the Turkish Food Codex.

Table 2. Total aflatoxin (B1, B2, G1 and G2) and aflatoxin B1 contents of Şebinkarahisar walnut variety collecting different years

Product	2016		2017	
	AFT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AFB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AFT ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	AFB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Tamzara	0.464 ± 0.01	0.394 ± 0.01	0.422 ± 0.01	0.387 ± 0.01
Kırkgöz-I	0.477 ± 0.01	0.396 ± 0.01	0.459 ± 0.01	0.382 ± 0.01
Kırkgöz-II	0.461 ± 0.01	0.401 ± 0.01	0.438 ± 0.01	0.373 ± 0.01
Kırkgöz-III	0.845 ± 0.02	0.628 ± 0.02	0.828 ± 0.02	0.415 ± 0.01
Yıldıracı	0.427 ± 0.01	0.383 ± 0.01	0.410 ± 0.01	0.372 ± 0.01
Yedikardeş-I	0.466 ± 0.01	0.377 ± 0.01	0.439 ± 0.01	0.356 ± 0.01
Yedikardeş-II	0.561 ± 0.01	0.436 ± 0.01	0.515 ± 0.01	0.418 ± 0.01
Evcili	0.415 ± 0.01	0.406 ± 0.01	0.407 ± 0.01	0.392 ± 0.01
Biroğul	0.488 ± 0.01	0.458 ± 0.01	0.464 ± 0.01	0.433 ± 0.01
Avutmuş	0.592 ± 0.02	0.511 ± 0.01	0.583 ± 0.01	0.499 ± 0.01
Ovacık	0.502 ± 0.01	0.424 ± 0.01	0.489 ± 0.01	0.400 ± 0.01
Çakır	0.575 ± 0.01	0.457 ± 0.01	0.556 ± 0.01	0.434 ± 0.01
Kütküt	0.481 ± 0.01	0.411 ± 0.01	0.434 ± 0.01	0.398 ± 0.01
Altınçevre	0.500 ± 0.01	0.466 ± 0.01	0.429 ± 0.01	0.440 ± 0.01
Toplukonak	0.530 ± 0.01	0.416 ± 0.01	0.488 ± 0.01	0.373 ± 0.01
Gürpınar	0.538 ± 0.01	0.438 ± 0.01	0.512 ± 0.01	0.394 ± 0.01
Turpçu	0.575 ± 0.01	0.407 ± 0.01	0.519 ± 0.01	0.399 ± 0.01
Kavaklar	0.564 ± 0.01	0.424 ± 0.01	0.474 ± 0.01	0.374 ± 0.01
Konak	0.447 ± 0.01	0.403 ± 0.01	0.445 ± 0.01	0.401 ± 0.01
Çiftlik	0.672 ± 0.02	0.630 ± 0.02	0.640 ± 0.01	0.308 ± 0.01

AFT: Total Aflatoxin, AFB1: Aflatoxin B1

Climatic Conditions

In recent years, climatic characteristics have started to change in Turkey as in all over the world. Therefore, determining the effects of

climatic characteristics in healthy product production or storage is important in terms of reliable food. In the present study, climatic data for the sampling months such as temperature,

humidity, and precipitation were analyzed according to months and years. It has been determined that the humidity rate of 2016 is 6.15% wider than in 2017. During the year 2016, the highest humidity was recorded in month of January with 72.5%. These rates were determined as 56% and 53.3%, respectively in September and October which is the walnut harvest and drying time. Also, the lowest humidity content was obtained from April with 45.4% (Figure 1). The highest average precipitation rate was found as 106.10 kg/m² in May 2016 as in the humidity rate. This rate was 5.09% higher than in May 2017. When the total average precipitation rate was examined throughout the year, it is determined

that 2017 has received 4.23% more precipitation than in 2016 (Figure 2). When the temperature changes were compared, it was calculated that 2017 was 6.7% warmer than in 2016. During the year 2017, the highest temperature of 22.4 °C was recorded in the month of August with the lowest temperature (3.0 °C) recorded in February and the average for was determined to be 10.4 °C. In July, August and September, which is the walnut growing, harvesting and drying seasons, the average temperature is determined as 21.37 °C. 2016 was a colder year with 18.77 °C. The average annual temperature in this year is 9.7 °C (Figure 3).

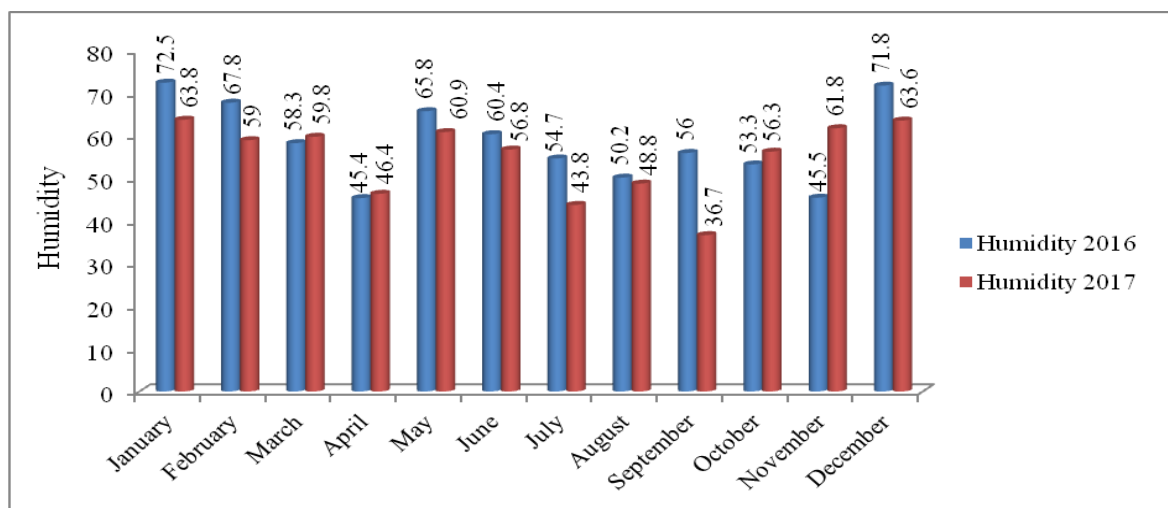


Figure 1. Mean values of monthly humidity distributions for different years

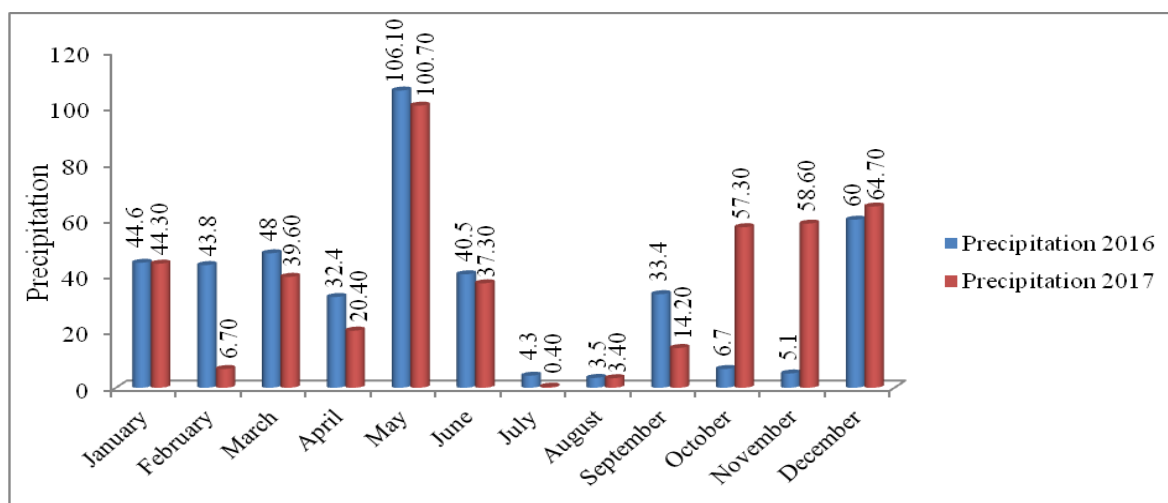


Figure 2. Mean values of monthly precipitation for different years

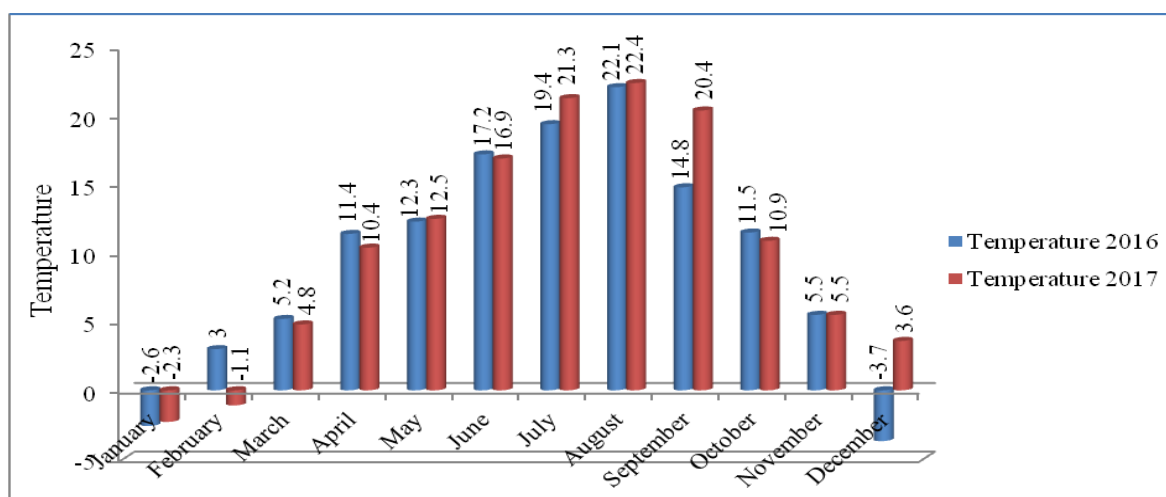


Figure 3. Mean values of monthly average temperature distributions for different years

The Relationship between Climate Data and Aflatoxin

The results of the statistical analysis revealed a correlation between AFT and AFB1 in both 2016 and 2017. In 2016, a strong correlation was found between AFT and AFB1 with $r = 0.920$. In 2017, this ratio was calculated as $r = 0.543$ due to the decrease in the average humidity content on an annual basis (Table 3, $P < 0.01$). In contrast, statistical analyzes showed that the seasonal changes (humidity, temperature, and

precipitation) in 2016 and 2017 were not effective on AFT and AFB1 (Table 4). In 2017, the annual average precipitation and temperature values increased by 4.48% and 7.2%, respectively, compared to the previous year and the humidity rate decreased by 6.33% compared to 2016 year. This situation did not cause increase in AFT and AFB1 ratios in Şebinkarahisar which has continental seasonal changes.

Table 3. Spearman correlation coefficient between climatic factors and AFT and AFB1 of Şebinkarahisar walnut in 2016

	Humidity	Temperature	Precipitation	AFT	AFB1
Humidity	1.000		- 0.648*		
Temperature		1.000	- 0.608*		
Precipitation	- 0.648*	- 0.608*	1.000		
AFT				1.000	0.920**
AFB1				0.920**	1.000

** Correlation is significant at the 0.01 level (2- tailed), * Correlation is significant at the 0.05 level (2- tailed), AFT: Total Aflatoxin, AFB1: Aflatoxin B1.

Table 4. Spearman correlation coefficient between climatic factors and AFT and AFB1 of Şebinkarahisar walnut in 2017

	Humidity	Temperature	Precipitation	AFT	AFB1
Humidity	1.000	0.734**	- 0.748**		
Temperature	0.734**	1.000			
Precipitation	- 0.748**		1.000		
AFT				1.000	0.543*
AFB1				0.543*	1.000

** Correlation is significant at the 0.01 level (2- tailed), * Correlation is significant at the 0.05 level (2- tailed), AFT: Total Aflatoxin, AFB1: Aflatoxin B1

DISCUSSION

The world population tends to rise rapidly. This increase in the need for reliable clean food is increasing day by day. Turkey has a rich variety in terms of nutrient diversity. Reliable food consumption in this variety is important in our country as well as the whole world. Turkey is a pioneer in the production of tea, hazelnuts, peanuts, walnuts, dried fruits, spices and corn products. The fact that the aflatoxin content of these products are, at the determined standards, is important for health and for the country's economies. In this variety, Şebinkarahisar walnut variety holds an important place. Although there are many studies in the literature about the determination of aflatoxin content of dried eggplant and green bell pepper (Çağındı and Gürhayta, 2016), flour (Özturan et al., 2007), dark red ground pepper, hazelnut and roasted chickpeas (Gürses, 2006) in Turkey, there is no study to determine the aflatoxin contents of walnut variety growing in Şebinkarahisar by evaluating the seasonal changes. Besides, aflatoxin contents in foods produced under different conditions have tried to be determined by many researchers in the world. A detailed literature survey has revealed the importance of founding these toxic harmful metabolites in foods. (Leong et al., 2010; El tawila et al., 2012; Adaya-González et al., 2015). Set and Erkmen (2010) have reported that AFT and AFB1 content of packaged and unpackaged ground red paper and pistachio nut samples was determined on the allowed legal limits. Gürses (2006) was studied on different groups of commodities as hazelnut, walnut, peanut, almond and roasted chickpea collected from retailers, markets, and dried fruit retail shops in Erzurum. The researcher found that in 27.66% of 94 analysed samples had an AFB1 ratio above the allowed legal limits. In a similar report, 28 of 126 different food products sold in Qatar markets were found to have AFB1 ratios ranging from 0.14 to 81.64 µg/kg (Abdulkadar et al., 2004). These researchers have found that the highest ratio of aflatoxin was in pistachio samples with 81.64 µg/kg. In a study conducted by Lutfullah and Hussain (2011) on the products offered for sale in Pakistan, 40% and

70% aflatoxin was found in shelled walnuts and unshelled walnuts, respectively.

CONCLUSION

Aflatoxin contamination in foodstuffs is an undesirable situation in all processes (from raw material to field development, harvesting, storage, transportation, product processing and product production) from the field to table. As well as all over the world, this situation should be followed up in all processes of the products produced up to consumption in Turkey, and good agricultural practices should be achieved. None of the 20 different walnut samples examined within the scope of the study was found to have AFT and AFB1 ratios above the allowed legal levels under Şebinkarahisar seasonal changes.

REFERENCES

- Abdulkadar, A.H.W., Al-Ali, A.A., Al-Kildi, A.M., Al-Jedah, J.H. (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, 15: 543-548.
- Adaya-González, J., Carvajal-Moreno, M., Rojo-Callejas, F., Ruiz-Velasco, S. (2015). Aflatoxins in walnut (*Juglans regia* L.), pecan (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch) and cashew (*Anacardium occidentale* L.) nuts of Mexico. *Pharm Anal Acta*, 6(2): 338.
- Anonymous, (2013a). FAO Statistical Database, <http://apps.fao.org/page/collecionsubset:agriculture> (Accessed: 25.03.2015)
- Anonymous, (2015b). FAO, Agriculture Statistics Database. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Accessed: 30.12.2015).
- Çağındı, Ö., Gürhayta, O.F. (2016). Aflatoxins and ochratoxin A in dried eggplant and green bell pepper. *Food Control*, 70: 216-220.
- Castells, M., Marin, S., Scanchis, V., Ramos, A.J. (2008). Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing. *Int J Food Microbiol*, 123: 81-87.
- Chun, H.S., Kim, H.J., Ok, H.E., Hwang, J., Chung, D. (2007). Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chem*, 102: 385-391.

- EC (European Commission), (2006). Commission regulation 1881/2006 of December 19, 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of European Community, L 364, 16.
- El Tawila, M., Neamatallah, A., Serdar, S. (2012). Incidence of aflatoxins in commercial nuts in the Holy city of Mekkah. *Food Control*, 29: 121-124.
- Erkmen, O., Bozoglu, T.F. (2008a). Food Microbiology 1: Microorganisms in foods, microbial growth, foodborne diseases and detection of microorganisms and their toxins. Ilke Publishing Company, Ankara.
- Directive 2003/87/EC of the European Parliament and of the Council of 13 October 2003 establishing a scheme for greenhouse gas emission allowance trading within the Community and amending Council Directive 96/61/EC.
- Gürses, M. (2006). Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almonds and roasted chickpeas (leblebi) sold in Turkey. *Int J Food Prop*, 9: 395-399.
- IARC, (1993). IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Vol. 56, Toxins derived from *F. montiliform*: Fumonisin B1 and B2 and fusarin C: In some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Press, Lyons, pp. 445-466.
- IPCC, (2007). Intergovernmental panel on climate change report. Climate Change. Synthesis Report. 2007; 52.
- Karadeniz, T., Şişman, T. (2015). Giresun Şebinkarahisar cevizleri. ÜÇM Yayınları ISBN 978-605-89150-6-0. Ankara.
- Leong, Y.H., Ismail, N., Latif, A.A., Ahmad, R. (2010). Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. *Food Control*, 21: 334-338.
- Leszczyńska, J., Masłowska, J., Owczarek, A., Kucharska, U. (2001). Determination of aflatoxins in food products by the ELISA method. *Czech J Food Sci*, 19: 8-12.
- Lutfullah, G., Hussain, A. (2011). Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*, 22: 426-429.
- Magan N., Medina A., Aldred D. (2011). Possible climate change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and post-harvest. *Plant Pathol*, 60: 150-163.
- Moss, M.O. (1998). Recent studies of mycotoxins. *J Appl Microbiol Symposium Suppl*, 84: 62S-76S.
- Özturan, K., Ünsal, C., Karakaya, Y., Atasever, M., Ceylan, Z.G., Atasever, M.A., Demirkaya, A.K. (2007). Erzurum'da tüketime sunulan buğday unlarının toplam aflatoksin, aflatoksin B1 ve okratoksin A yönünden incelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 2(4): 172-176.
- Park, J.W., Kim, E.K., Kim, Y.B. (2004). Estimation of the daily exposure of Koreans to aflatoxin B1 through food consumption. *Food Addit Contam*, 21: 70-75.
- Paterson R., Lima N. (2011). Further mycotoxin effects from climate change. *Food Res Int*, 44: 2555-2566.
- Pohland, A.E. (1993). Mycotoxins in Review. *Food Addit Contam*, 10: 17-28.
- Reza, S.S.M., Masoud, A., Ali, T., Faranak, G., Mahboob, N. (2012). Determination of aflatoxins in nuts of Tabriz confectionaries by ELISA and HPLC methods. *Adv Pharm Bull*, 2(1): 123-126.
- Set, E., Erkmen, O. (2010). The aflatoxin contamination of ground red pepper and pistachio nuts sold in Turkey. *Food Chem Toxicol*, 48: 2532-2537.
- Shukla, S. (2016). Estimation of aflatoxins in peanut or maize by enzyme linked immunosorbent assay. *Bangladesh J Pharmacol*, 11: 628-631.
- Spearman, C.E. (1904). The proof and measurement of association between two things. *Am J Psychol*, 15: 72-101.
- TGK (Türk Gıda Kodeksi), (2011). Türk Gıda Kodeksi, Bulaşanlar Yönetmeliği, Resmi Gazete, No:28157 (3. Mükerrer). 29.12.2011.
- Wu F., Bhatnagar D., Bui-Klimke T., Carbone I., Hellmich R.L., Munkvold G.P., Paul P., Payne G., Takle E.S. (2011). Climate change impacts on mycotoxin risks in US maize. *World Mycotoxin J*, 4: 79-93.

**SURVIVAL OF ACID ADAPTED AND NON-ADAPTED STATIONARY PHASE
*ESCHERICHIA COLI*O157:H7, *SALMONELLA* TYPHIMURIUM AND
LISTERIA MONOCYTOGENES IN POMEGRANATE JUICE**

Zeynal Topalcengiz^{1,*}, Sefa Işık², Hasan Işık², Senem Güner³

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Architecture, Muş Alparslan University, Muş, Turkey

²Department of Food Processing, Vocational School of Technical Sciences, Muş Alparslan University, Muş, Turkey

³Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey

Received / Geliş: 16.03.2019; Accepted / Kabul: 07.07.2019; Published online / Online baskı: 24.07.2019

Topalcengiz, Z., Işık, S., Işık, H., Güner, S. (2019). Survival of acid adapted and non-adapted stationary phase *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enterica Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in pomegranate juice. *GIDA* (2019) 44 (4): 681-691 doi: 10.15237/gida.GD19059

Topalcengiz, Z., Işık, S., Işık, H., Güner, S. (2019). Aside adapte ve adapte olmayan durağan faz *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium ve *Listeria monocytogenes*'in nar suyundaki canlı kalma sürelerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (4): 681-691 doi: 10.15237/gida.GD19059

ÖZ

The purpose of this study was to evaluate the survival of acid adapted and non-adapted stationary phase *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in pomegranate juice at refrigeration and room temperatures. Inoculated juice samples were stored at 4 and 24 ± 2°C. Population of pathogens were enumerated for up to 28 days. Reduction rates, time required for one log reduction, of tested microorganisms were calculated. Enrichment was negative for *E. coli* O157:H7 after a week at all tested conditions. At refrigeration temperature, acid adapted *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* survived one week longer than non-adapted cells. At room temperature, *S. Typhimurium* population decreased up to 7 log CFU/ml in 28 days; *L. monocytogenes* survived less than 12 h. Rates of reduction (days) ranged between 0.06 and 4.29 for all tested pathogens ($P < 0.05$). Tested pathogens can survive in contaminated pomegranate juice until consumption to cause foodborne illness.

Keywords: Acid adaptation, survival, pomegranate juice, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*

ASİDE ADAPTE VE ADAPTE OLMAYAN DURAĞAN FAZ *ESCHERICHIA COLI* O157:H7, *SALMONELLA* TYPHIMURIUM VE *LISTERIA MONOCYTOGENES*'İN NAR SUYUNDAKİ CANLI KALMA SÜRELERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, aside adapte olan ve adapte olmayan durağan faz *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium ve *Listeria monocytogenes*'in buzdolabı ve oda sıcaklıklarında canlı kalma sürelerini değerlendirmektir. İnoküle edilmiş meyve suyu örnekleri 4 ve 24 ± 2 ° C'de muhafaza edilmiştir. Patojenlerin popülasyonları 28'inci güne kadar sayılmıştır. Popülasyon indirgeme oranları, bir log indirgeme için gereken süre, test edilen mikroorganizmalar için hesaplanmıştır. Bir hafta sonunda *E. coli* O157:H7 için zenginleştirme bütün test edilen koşullarda negatif olarak belirlenmiştir. Buzdolabı sıcaklığında, aside adapte *S. Typhimurium* ve *L. monocytogenes*, adapte olmayan hücrelere göre 1 hafta daha uzun süre hayatta kalmıştır. Oda sıcaklığında, *S. Typhimurium* popülasyonu 28 günde 7 log CFU/ml düşmüştür ama *L. monocytogenes* sadece 12 saat canlı kalabilmiştir. Popülasyon azalma oran aralıkları (gün) bütün test edilen patojenler için 0.06-4.29 aralığındadır ($P < 0.05$). Test edilen patojenler kontamine olmuş nar suyunda gıda kaynaklı hastalığa neden olacak kadar uzun süre hayatta kalabilir.

Anahtar kelimeler: Asit adaptasyonu, canlı kalma, nar suyu, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria*

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar;

✉ z.topalcengiz@alparslan.edu.tr,

☎ (+90) 436 249 4949

☎ (+90) 436 249 1025

INTRODUCTION

Fruit juices are important global commodities with consumer profiles from all age groups. Microorganisms including yeasts, molds and acid tolerant bacteria species can cause spoilage of fruit juices. Fruit juices may harbor foodborne pathogens. Outbreaks of *Cryptosporidium parvum*, shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Salmonella* spp. associated with the consumption of unpasteurized fruit juices occurred in the United States (U.S.) between 1995 and 2012 (Centers for Disease Control and Prevention; CDC, 2014; Danyluk et al., 2012; Vojdani et al., 2008). No outbreak of *Listeria* species was implicated for fruit juice related outbreaks; however, *Listeria monocytogenes* is considered as a risk of contamination in fruit juice production due to its ubiquitous nature (FDA, 2004; Vojdani et al., 2008). Pathogens are commonly eliminated by thermal pasteurization in fruit juices to comply with regulations. However, freshly squeezed juices remain as a potential source of foodborne diseases due to no inactivation process prior to consumption.

Pomegranate (*Punica granatum* L.) juice consumption have increased during last decades due to increasing popularity of health promoting potential of fruit and its juice (Türkyılmaz et al., 2013). The several health benefits of pomegranate have been claimed on various health problems including high cholesterol, inflammation, cardiovascular diseases and different type of cancer (Zarfeshany et al., 2014). High anthocyanins content of pomegranate juice provides its characteristic red color that invites consumers' notice as first glimpse on market shelves (Nachay, 2009; Vegara et al., 2013). During thermal pasteurization and storage of juice, bright color of juice turns to a brownish color that is reducing sensory and nutritive properties of juice due to degradation of unstable anthocyanins molecules (Vegara et al., 2013). Brightness and fruity properties of fresh squeezed pomegranate juice attracts the interest of consumers. However, consumption of fresh squeezed juice increases concerns about foodborne pathogens due to risk of contamination.

Pathogens can survive for extended periods of time to cause gastrointestinal diseases in fruit juices (Piotrowski, 2003; Parish and Higgins, 1989; Oyarzabal et al., 2006). Survival of bacterial foodborne pathogen in fruit juice and juice concentrates have been studied at different storage temperatures. Duration of survival varies depending on type and composition of juice, storage temperature, and strains of pathogenic bacterial species (Álvarez-Ordóñez, 2013; Oyarzabal et al., 2006; Parish and Higgins, 1989; Piotrowski, 2003). Some foodborne pathogens, including STEC, *Salmonella* spp., and *L. monocytogenes* have acid adaptation mechanisms that increase their survival and thermal tolerance capability in acidic conditions. Acid adaptation increases time and temperature to inactivate pathogens during pasteurization (Mazzotta, 2001; Ryu and Beuchat, 1998; Sharma et al., 2005; Topalcengiz and Danyluk, 2017).

Several numbers of studies have been published about the survival of pathogens in fruit juices including grape, orange, apple juice and apple cider. Pathogens can survive long enough to cause outbreaks in apple and orange juices. The objective of this study is to determine the survival of *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, and *L. monocytogenes* that are considered a potential cause of outbreak in pomegranate juice. Results reported in here provides information about the risk of outbreak associated with pomegranate juice in case of inadequate pasteurization and the consumption of unpasteurized juice.

MATERIALS AND METHODS

Juice

One brand of 100% pasteurized pomegranate juice with a single lot number was bought from a local market. The pH and soluble solid content (°Brix) of pomegranate juice was measured with a pH meter (HACH, HQ30d Portable Multi Meter, CO, USA) and refractometer (Index Instrument, PTR 2a, USA). Fruit juice was stored at -20 °C until use.

Bacterial strains and growing conditions

One strain of *E. coli* O157:H7 (ZT:10; food isolate), *S. Typhimurium* (ATCC 14028; orange juice outbreaks of 1999) and *L. monocytogenes*

serotype 4b strains (ATCC 19115) were used. Frozen (-80 °C) *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* strains were streaked onto tryptic soy agar (TSA; Biolife; Milan, Italy) plates to obtain working cultures. Frozen *L. monocytogenes* was converted to working culture by plating on TSA supplemented with 0.6% yeast extract (TSAY; Biolife; Milan, Italy). All plates were incubated at 37 ± 2 °C for 24 ± 2 h. A colony of active strains were inoculated in 10 ml of tryptic soy broth without glucose (TSBNG; Neogen; Lanchashire, UK) and in TSB containing 1% glucose (Merck KGaA, Darmstadt, Germany: TSBG: 10 g/L) to grow non-adapted and acid-adapted cells, respectively. All media used for *L. monocytogenes* was supplemented with 0.6% yeast extract (Biolife; Milan, Italy) as described in Bacteriological Analytical Method by Food and Drug Administration (Hitchins et al., 2017). Fermentation of glucose in TSBG decreased the pH of media causing the development of acid adaptation ($P < 0.05$) (Table 1) (Buchanan and Edelson, 1996). After incubation at 37 ± 2 °C for 18 ± 2 h, 100 µl of grown cultures were transferred to another sets of TSBNG and TSBG tubes. All tubes were incubated at 37 ± 2 °C for 18 ± 2 h. After incubation, cells were washed three times by centrifugation at $3030 \times g$ for 10 min (Thermo Scientific, Labofuge 200 Benchtop Centrifuge, Germany) followed by the replacement of supernatant with 10 ml of 1% peptone water (Biolife; Milan, Italy). To prepare inoculum, washed pellets were resuspended in 5 ml pomegranate juice to obtain an initial concentration between $10^8 - 10^{10}$ CFU/ml.

Table 1. pH values of tryptic soy broth with no glucose (TSB-NG) and tryptic soy broth containing 1% glucose (TSBG) before harvesting grown strains (n=3).

Strain or serotype	Media	pH
<i>E. coli</i> O157:H7 (ZT10)	TSB-NG	$7.02 \pm 0.01a$
	TSBG	$4.82 \pm 0.03b$
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	TSB-NG	$7.13 \pm 0.02a$
	TSBG	$4.95 \pm 0.04b$
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 19115)	*TSB-NG	$6.63 \pm 0.02a$
	*TSBG	$4.38 \pm 0.03b$

The same letter within each pathogen are not significantly different ($P > 0.05$).

*Supplemented with 0.6% yeast extract.

Inoculation of pomegranate juices and enumeration

Fruit juice (10 ml) was dispensed in sterile 15 ml centrifuge tubes (LABSOLUTE®, Germany), aseptically. A separate set of tubes was prepared for each sampling time to minimize the chance of contamination. Tubes were acclimated to storage temperatures (4 and 24 ± 2 °C) 12 hours before inoculation. Inocula (0.1 ml) was added to 10 ml juice and vortexed to achieve a final concentration of 10^6 CFU/ml. The tubes were tightly capped and stored at 4 and 24 ± 2 °C for 28 days. Population of pathogens from each adaptation and temperature combinations was enumerated at 0, 2, 4, 8, 12, and 24 h and on days 2, 3, 5, 7, 14, 21, and 28. Inoculated fruit juice samples stored at refrigeration and room temperatures were sampled and diluted if necessary for spread plating on TSA for *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* and on TSAY for *L. monocytogenes* in duplicate. All plates were incubated at 37 ± 2 °C for 24 ± 2 h for *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* and at 37 ± 2 °C for 48 ± 2 h for *L. monocytogenes*. If populations were expected to be below 1.0 log CFU/ml (10 CFU/ml), one ml of undiluted sample was spread plated onto four plates as 250 µl per plate to lower limit of detection. Three repetitions were performed for each temperature and adaptation condition (n=3). Background microbiota of pomegranate juice samples were tested by spreading uninoculated juice samples on TSA.

Enrichment

When no plate counting ranges were predicted, each replicate of juice samples was enriched. 5 ml of TSB for *E. coli* O157:H7, lactose broth (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for *Salmonella*, and TSB supplemented with 0.6% yeast extract (TSBY) for *L. monocytogenes* was added on remaining juice samples in centrifuge tubes. After incubation at 37 ± 1 °C for 24 ± 1 h, one loopful (10 µl) of enriched samples was streaked onto sorbitol MacConkey agar (SMAC; Biolife; Milan, Italy) for *E. coli* O157:H7, xylose lysine desoxycholate agar (XLD; Biolife; Milan, Italy) for *S. Typhimurium*, and *Listeria* oxford agar (LOX; Liofilchem, Abruzzo, Italy) for *L. monocytogenes*. When typical colonies were

observed, the population of pathogen in each replicate was recorded as 0.3 log CFU/ml (limit of detection).

Statistical analysis

Log transformed population of tested pathogens were plotted against time. Time required for one log CFU/ml reduction (rates of reduction) were calculated by drawing linear trendlines in survival plots from day zero to first time point that cell population decreased more than 5-log for all microorganisms. Populations of cells for each condition were compared for each time point statistically by Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's HSD test. The statistical difference among decline rates were calculated with Analysis of Covariance (ANCOVA). All data was processed using Microsoft Excel, 2013 and JMP 11 software (SAS® Institute Inc., Cary, NC, USA, 2013). The alpha value was set at 0.05.

RESULTS

No background microbiota was detected in pomegranate juice used in this study. The pH and soluble solid content (corrected °Brix) of pomegranate juice was 3.23 ± 0.02 and 16.1, respectively. Strains grown in TSB without glucose yielded a final pH close to neutral ranging from 6.63 and 7.13 (Table 1). The presence of 1% glucose decreased the pH of growth medium to mild acidic conditions (4.38 – 4.95) where acid adaptation occurs. The growth *L. monocytogenes* in TSBY reduced pH values 0.4 lower compare to *E. coli* O157:H7 and *S. Typhimurium* possible due to the addition of yeast extract to support the growth.

Survival of *E. coli* O157:H7

The population of non-adapted and acid adapted *E. coli* O157:H7 decreased around 1.4 and 2.6 log CFU/ml after one day of storage at 4°C ($P < 0.05$) (Fig 1A). The populations of acid adapted cell were up to 1.5 log CFU/ml lower than non-adapted cells starting from Day 1 ($P > 0.05$). A gradual decline over 6 log CFU/ml was observed until Day 7 at 4°C. No positive enrichment was detected after Day 5 except for non-adapted cells sampled at Day 21 (Fig 1A). At 24°C, similar survival trends were observed for both non-

adapted and acid adapted cells (Fig 1B). Population of acid adapted *E. coli* O157:H7 was up to 1.0 log CFU/ml higher than non-adapted cells at all sampling times until Day 7. Both non-adapted and acid adapted cell populations depleted at Day 7 at 24°C with the exception of non-adapted cells at Day 14. No significant difference was calculated between non-adapted and acid adapted cells stored at 4 and 24°C after Day 7 ($P > 0.05$). Population of non-adapted and acid adapted *E. coli* O157:H7 was higher in samples stored at 4°C at Day 1, 2 and 3 ($P < 0.05$).

Survival of *S. Typhimurium*

No increase in *S. Typhimurium* populations occurred at all tested conditions and storage temperatures after incubation of inoculated juice samples. Limited decline (up to 1.0 log CFU/ml) was observed in both non-adapted and acid adapted *S. Typhimurium* population in pomegranate juice samples after 24 h storage at 4°C (Fig 2A). The population of acid adapted *S. Typhimurium* was higher than non-adapted cells at sampling Day 2, 3, 5, 7, and 14 at 4°C ($P < 0.05$). Acid adaptation increased survival of *S. Typhimurium* at 4°C. No positive enrichment was detected starting from Day 14 for non-adapted cells and Day 21 for acid adapted cell. At 24°C, both non-adapted and acid adapted cells showed similar survival trends (Fig 2B). However, population of non-adapted cells fluctuated after Day 7 compare to acid adapted cells with a gradual decrease until Day 21 ($P < 0.05$). The population of non-adapted *S. Typhimurium* was lower than acid adapted cells from 12 h to 21 days of storage at 24°C until Day 14 ($P < 0.05$). Non-adapted and acid adapted *S. Typhimurium* stored at 24°C survived two week and one week longer than cells kept at 4°C, respectively.

Survival of *L. monocytogenes*

Storage temperature affected the survival of both non-adapted and acid adapted *L. monocytogenes* in pomegranate juice, dramatically. The population of non-adapted and acid adapted *L. monocytogenes* decreased around 2.0 log CFU/ml at 4°C after 24 h storage, but no positive samples were detected at 24°C in samples enumerated at 12 h (Fig 3A). At 4°C, similar but statistically significant survival

trends were observed for both non-adapted and acid adapted cells until Day 14 ($P < 0.05$) (Fig 3B). Acid adaptation extended the survival of cells stored at 4°C for three weeks compare to two weeks of non-adapted survival. A gradual decline of acid adapted *L. monocytogenes* were observed for samples held at 4°C. After storage at 24°C for 12

h, no survived cells were recovered for both non and acid adapted samples. In two hours, *L. monocytogenes* population decreased about 50% compare to initial concentration. The population of non-adapted and acid adapted *L. monocytogenes* stored at 4°C was higher than cells kept at 24°C starting from 2 hours ($P < 0.05$).

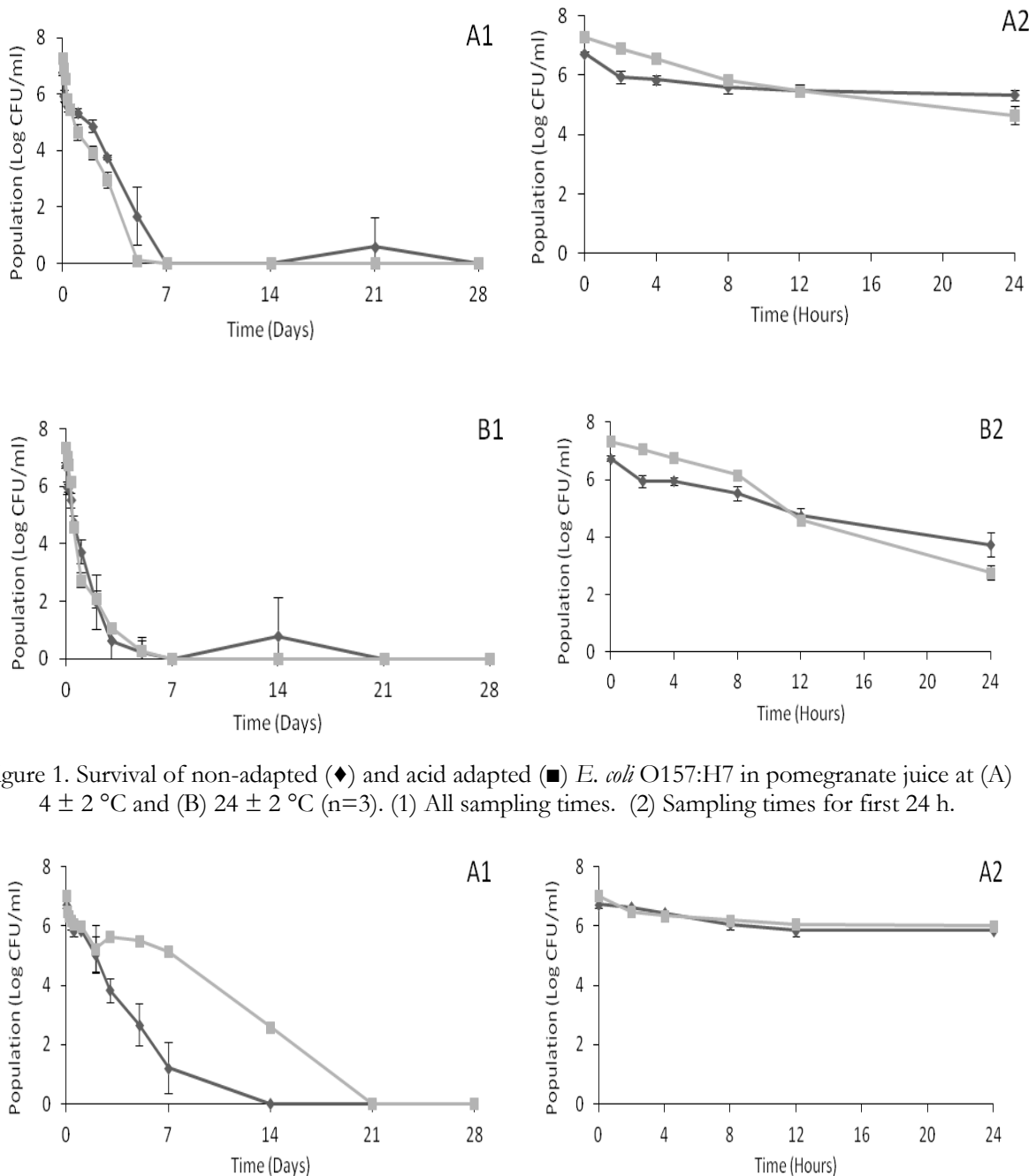


Figure 1. Survival of non-adapted (◆) and acid adapted (■) *E. coli* O157:H7 in pomegranate juice at (A) 4 ± 2 °C and (B) 24 ± 2 °C (n=3). (1) All sampling times. (2) Sampling times for first 24 h.

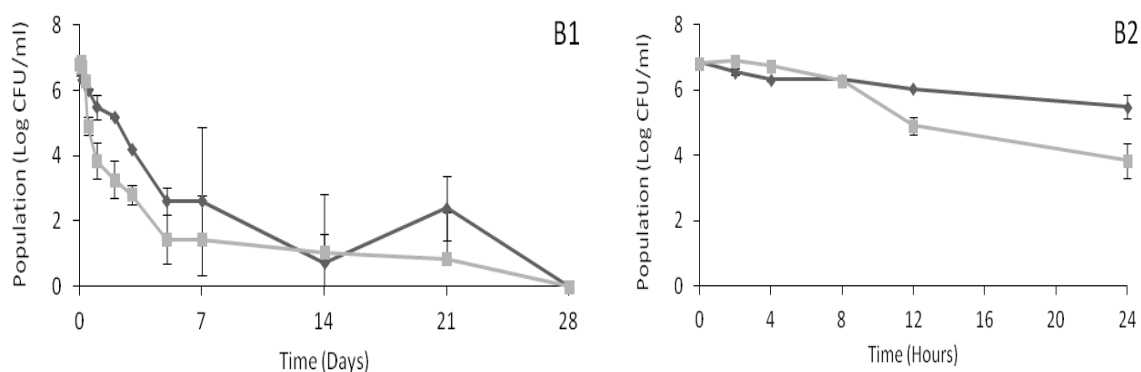


Figure 2. Survival of non-adapted (◆) and acid adapted (■) *Salmonella Typhimurium* in pomegranate juice at (A) 4 ± 2 °C and (B) 24 ± 2 °C (n=3). (1) All sampling times. (2) Sampling times for first 24 h.

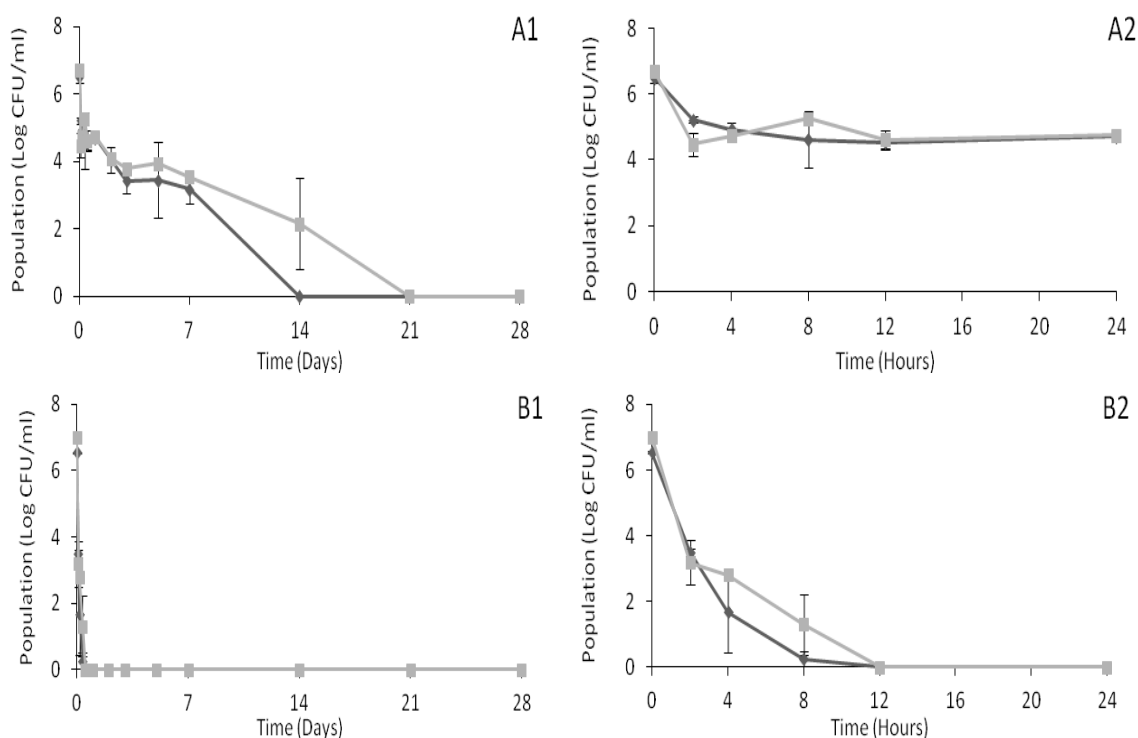


Figure 3. Survival of non-adapted (◆) and acid adapted (■) *Listeria monocytogenes* in pomegranate juice at (A) 4 ± 2 °C and (B) 24 ± 2 °C (n=3). (1) All sampling times. (2) Sampling times for first 24 h.

Reduction rates of tested strains

All reduction rates are shown with R^2 of linear regression equations in Table 2. R^2 values calculated for linear reduction equations were between 0.79 and 0.99 for all tested pathogens at all conditions. Rate of reductions, time required for one log reduction for each pathogen population, were higher for cells stored at 4°C for all tested microorganisms ($P < 0.05$) except for

non-adapted *S. Typhimurium*. The longest and shortest rate of reduction for *E. coli* O157:H7 were 1.17 days for non-adapted cells stored at 4°C and 0.36 days for acid adapted samples kept at room temperature. *S. Typhimurium* had longer decline rates than *E. coli* O157:H7 at all conditions and *L. monocytogenes* for samples stored at 24°C ($P < 0.05$). Calculated reduction rates of *S. Typhimurium* were 3.43 days for samples stored

at 4°C and 0.91 days for cells held at 24°C ($P < 0.05$). Reduction rates of *L. monocytogenes* were the lowest among all tested pathogens with values less than 2 h for both non-adapted and acid

adapted cells stored at 24 °C. *L. monocytogenes* had the longest reduction rates for samples kept at 4°C with a value of 2.78 days for non-adapted cells and 4.29 days for acid adapted cells ($P < 0.05$).

Table 2. Rates of reduction for each pathogen and temperature obtained from linear decline equations after initial 5-log reduction.

Pathogen	Adaptation	Temperature	Days used in equation	Equation	R ²	Reduction rates for 1 log (Day)
<i>E. coli</i> O157:H7	Non	4 °C	5	$y = -0.8587x + 6.1813$	0.9569	1.17 ^{aD}
		24 °C	3	$y = -1.9597x + 6.1442$	0.9714	0.51 ^{cC}
	Acid	4 °C	5	$y = -1.3131x + 6.622$	0.9639	0.76 ^{bE}
		24 °C	2	$y = -2.7949x + 6.8821$	0.8625	0.36 ^{dD}
<i>S. Typhimurium</i>	Non	4 °C	7	$y = -0.7719x + 6.5037$	0.989	1.30 ^{cD}
		24 °C	14	$y = -0.4459x + 6.1503$	0.9051	2.24 ^{bA}
	Acid	4 °C	21	$y = -0.2917x + 6.5008$	0.959	3.43 ^{aB}
		24 °C	5	$y = -1.1015x + 6.2539$	0.8512	0.91 ^{dB}
<i>L. monocytogenes</i>	Non	4 °C	14	$y = -0.3599x + 5.138$	0.8845	2.78 ^{bC}
		24 °C	0.33	$y = -17.921x + 5.6075$	0.8857	0.06 ^{eE}
	Acid	4 °C	21	$y = -0.2333x + 5.0553$	0.8663	4.29 ^{aA}
		24 °C	0.33	$y = -15.072x + 5.7686$	0.7846	0.07 ^{eE}

Reduction rates with the same letter within each pathogen are not significantly different ($P > 0.05$).

Reduction rates with the same capitalized letter in within each temperature are not significantly different ($P > 0.05$).

DISCUSSION

Due to high acidity of fruit juices, food borne pathogens were not considered as a threat to public health until first confirmed outbreak of *E. coli* O157:H7 associated with unpasteurized apple cider (Besser et al., 1993). The U.S. Food and Drug Administration (FDA) requires mandatory 5-log reduction of pertinent microorganisms in fruit juices under HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) rule (FDA, 2001). No outbreak related to the consumption of pasteurized fruit juices have occurred after mandatory HACCP in juice processing and packaging plants, however, unpasteurized fruit juices have been implicated as the source of foodborne outbreaks. Fruit juices can be contaminated by the use of dropped fruit, non-potable water, and the presence of cattle and wildlife in, or close to, the production or processing environment (Harris et al., 2003). Freshly squeezed juices can also be a cause of outbreak due to contaminated utensils and fruit itself or food handlers since pathogens can survive in fruit juice long enough to cause a food borne outbreak.

Various factors may influence the survival of microorganisms in fruit juices including the types of juices, strains of pathogens and storage temperatures. In this study, *E. coli* O157:H7 survived 5 (acid adapted cells) to 21 days (non-adapted cells), but 5 log CFU/ml reduction of *E. coli* O157:H7 took maximum 6 days in pomegranate juice. Similar or contradictory results have been reported about the survival of *E. coli* O157:H7 in various type of fruit juices. The population of *E. coli* O157:H7 declined 4 to 5 log CFU/ml in apple juice at 4 and 21°C after 7 days (Uljas and Ingham, 1998), 5 to 6 log CFU/ml at 4 and 10°C after 21 days in apple cider (Roering et al., 1999), and up to 7 log CFU/ml after 36 days of storage at 4°C and 25°C in apple cider, respectively (Zhao et al., 1993). Also, no positive *E. coli* O157:H7 were detected by Leyer et al. (1995) in apple cider after 28 h storage at 6°C. *S. Typhimurium* survived up to 14 and 21 days at 4 and 24°C in pomegranate juice with 6 to 7 log CFU/ml reduction in population, respectively. In apple juice, *S. Typhimurium* population decreased around 4 logs at 4 and 10°C after 21 days in apple cider (Roering et al., 1999). In contrast, the

population of *S. Typhimurium* dropped around 5 log CFU/ml in 10 days at 4°C and 1 day at 25°C (Álvarez-Ordóñez et al., 2013). Greater and shorter survival of *Salmonella* in apple and orange juice compare to pomegranate juice can be explained different pH and organic acid content and juice compositions.

Population of non-adapted and acid adapted *L. monocytogenes* in pomegranate juice decreased over 6.5 log CFU/ml until Day 14 and 21 at 4°C, respectively. Similar to results in this study, Piotrowski (2003) found that *L. monocytogenes* population decreased over 6.5 log CFU/ml in 12 days in white grape juice, in 14 days in apple cider, in 54 days in orange juice and in 12 hours in red grape juice at 4°C. Results in pomegranate juice is also in contrast to Roering et al. (1999) that reported 5 to 6 log CFU/ml reduction of *L. monocytogenes* in two days in apple cider held at 4°C. No positive sample was detected in any replicate stored at 24°C after 12 h storage. Karabiyikli et al. (2014) observed that decline in the population of *L. monocytogenes* was over 5 log CFU/ml after 3 h storage at 37°C in sour orange juice. This rapid decrease at room and body temperatures may be explained the increased inactivation effect of antimicrobial compounds in pomegranate and sour orange juice at higher temperatures. In general, *L. monocytogenes* in fruit juices is expected survive longer at refrigeration temperatures compare to room temperature similar to *E. coli* and *Salmonella*. However, the population of *L. monocytogenes* decreased up to 2 logs in tomato juice held at 5 and 30°C after 12 days of storage (Diakogiannis et al., 2017). Limited effect of temperature difference on the survival of *L. monocytogenes* in tomato juice is probably due to the higher pH of tomato juice above 4.0.

The addition of 1% glucose decreased the pH of growth medium to mild acidic conditions where strains could develop acid adaptation by fermentation of glucose as previously described (Buchanan and Edelson, 1996; Sharma et al., 2005). Acid adaptation prolonged the survival of *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* at 4°C. Álvarez-Ordóñez et al. (2013) reported that acid adaptation decreased survival of *S. Typhimurium*

at 4 and 10°C, but increased at 25 and 37°C in orange juice. Especially, acid adaptation increased survival ability of *L. monocytogenes* in pomegranate juice dramatically at 4°C ($P<0.05$). No improvement in survival was observed at 24 °C for all tested pathogens after acid adaptation. Thermal response of pathogens increased in fruit juices after acid adaptation and *Salmonella* spp. were reported with the lowest heat resistance in different type of juices at all tested conditions (Mazzotta, 2001; Sharma et al., 2005; Topalcengiz and Danyluk, 2017). In the same studies, shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) was determined as the most heat resistant at lower temperatures, but *L. monocytogenes* at higher temperatures. Compare to thermal inactivation studies, *Salmonella* survived longer than *E. coli* O157:H7 and *L. monocytogenes* in pomegranate juice at room and refrigerator temperatures.

The survival of pathogens in pomegranate juice was affected by storage temperatures. Acid adaptation decreased reduction rates for *E. coli* O157:H7; however, acid adapted *Salmonella* and *L. monocytogenes* had longer rates compare to non-adapted cells at both tested temperatures. Except for non-adapted *Salmonella* held at 4°C, all tested non-adapted and acid adapted pathogens stored at 4°C had longer rate of reductions. Especially, reduction rates of *L. monocytogenes* stored at 4°C were up to 70 times longer than cells kept at 24°C. Similar results from previous studies confirms that pathogens survive longer in different fruit juices at near refrigeration storage temperatures (Piotrowski, 2003; Williams et al., 2005; Uljas and Ingham, 1998). Antimicrobial activity of pomegranate fruit has been studied by several researchers. Extracts and compounds purified from different part of pomegranate has antibacterial, antifungal and antiviral activities (Jayaprakasha et al., 2006). The enhanced antimicrobial activity and acidity may be the reason for shorter reduction rates of pathogens stored at higher temperatures.

CONCLUSION

Pathogens associated with apple and orange juice outbreaks may cause gastrointestinal diseases due to the consumption of pomegranate juice if

pasteurization is performed under required limits. Pasteurization parameters for pomegranate juice should be determined for better understanding of antimicrobial effect. Freshly squeezed pomegranate juice has a potential of contamination since no inactivation process is applied. *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* and *L. monocytogenes* cannot proliferate in pomegranate juice in refrigeration and room temperatures. However, these pathogens can survive long enough if contamination occurs. Pomegranate fruits can be washed to reduce risk of contamination before freshly squeezed juices are prepared.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Muş Alparslan University-Scientific Research Coordination Unit under Project Number: BAP-17-MMF-4901-02.

REFERENCES

- Álvarez-Ordóñez, A., Valdés, L., Bernardo, A., Prieto, M., López, M. (2013). Survival of acid adapted and non-acid adapted *Salmonella* Typhimurium in pasteurized orange juice and yogurt under different storage temperatures. *Food Sci Technol Int*, 19(5): 407–414, doi: 10.1177/1082013212455343.
- Besser, R.E., Lett, S.M., Weber, J.T., Doyle, M.P., Barrett, T.J., Wells, J.G., Griffin, P.M. (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Jama*, 269(17): 2217–2220, doi: 10.1001/jama.1993.03500170047032.
- Buchanan, R.L., Edelson, S.G., 1996. Culturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the presence and absence of glucose as a simple means of evaluating the acid tolerance of stationary-phase cells. *Appl Environ Microbiol*, 62(11): 4009–4013, PMID: 8899990
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2014). Foodborne outbreak online database (FOOD). <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/> (Accessed: 27 February 2019).
- Danyluk, M.D., Goodrich-Schneider, R.M., Schneider, K.R., Harris, L.J., Worobo, R.W. (2012). Outbreaks of foodborne disease associated with fruit and vegetables juice, 1922–2010. EDIS Document FSHN 12-04. <http://ucfoodsafety.ucdavis.edu/files/223883.pdf> (Accessed: 28 July 2018).
- Diakogiannis, I., Proestos, C., Varzakas, T., Markaki, P. (2017). Survival of *Listeria Monocytogenes* in Tomato Juice at 5 and 30°C Storage. *Curr Res Nutr Food Sci*, 5(1), doi: 10.12944/CRNFSJ.5.1.01.
- Food and Drug Administration (FDA). (2001). Federal Register Final Rule – 66 FR 6137, January 19, 2001: Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP); Procedures for the Safe and Sanitary Processing and Importing of Juice. <https://www.federalregister.gov/documents/2001/01/19/01-1291/hazard-analysis-and-critical-control-point-hacp-procedures-for-the-safe-and-sanitary-processing-and> (Accessed: 28 July 2018).
- Food and Drug Administration (FDA). (2004). Guidance for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance. <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/Juice/ucm072557.htm> (Accessed: 28 July 2018).
- Jayaprakasha, G.K., Negi, P.S., Jena, B.S. (2006). Antimicrobial activities of pomegranate. In: Pomegranates, Ancient roots to Modern Medicine, Seeram, P., Schulman R.N, Heber, D. (Eds.). Taylor & Francis Group LLC, CRC press, Boca Raton FL, pp. 167–177.
- Harris, L.J., Farber, J.N., Beuchat, L.R., Parish, M.E., Suslow, T.V., Garrett, E.H., Busta, F.F. (2003). Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Compr Rev Food Sci F*, 2(1): 78–141, doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x
- Hitchins, A.D., Jinneman, K., Chen, Y. (2017). Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods->

- food/bam-detection-and-enumeration-listeria-monocytogenes (Accessed: 8 May 2019).
- Karabıyıklı, Ş., Değirmenci, H., Karapınar, M. (2014). Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Sci Technol*, 55 (2): 421–425, doi: 10.1016/j.lwt.2013.10.037.
- Leyer, G.J., Wang, L.L., Johnson, E.A. (1995). Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl Environ Microbiol*, 61(10): 3752–3755.
- Mazzotta, A.S. (2001). Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *J Food Prot*, 64(3): 315–320, doi: 10.4315/0362-028X-64.3.315.
- Nachay, K. (2009). A new color palette emerges. *Food Technol*, 63(4): 50–62.
- Oyarzabal, O.A., Nogueira, M.C., Gombas, D.E. (2003). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in juice concentrates. *J Food Prot*, 66(9): 1595–1598, doi: 10.4315/0362-028X-66.9.1595.
- Parish, M.E., Higgins, D.P. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J Food Prot*, 52(3): 144–147, doi: 10.4315/0362-028X-52.3.144.
- Piotrowski, C.L. (2003). Survival of *Listeria Monocytogenes* in fruit juices during refrigerated and temperature-abusive storage. Master Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, VA, 85 s.
- Roering, A.M., Luchansky, J.B., Ihnot, A.M., Ansay, S.E., Kaspar, C.W., Ingham, S.C. (1999). Comparative survival of *Salmonella* Typhimurium DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. *Int J Food Microbiol*, 46(3): 263–269, doi: 10.1016/S0168-1605(98)00198-6.
- Ryu, J.H., Beuchat, L.R. (1998). Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *Int J Food Microbiol*, 45(3): 185–193, doi: 10.1016/S0168-1605(98)00165-2.
- Sharma, M., Adler, B.B., Harrison, M.D., Beuchat, L.R. (2005). Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Lett Appl Microbiol*, 41(6): 448–453, doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01797.x.
- Topalcengiz, Z., Danyluk, M.D. (2017). Thermal inactivation responses of acid adapted and non-adapted stationary phase Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in orange juice. *Food Control*, 72: 73–82, doi: 10.1016/j.foodcont.2016.07.014.
- Türkyılmaz, M., Tağı, Ş., Dereli, U., Özkan, M. (2013). Effects of various pressing programs and yields on the antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic content and colour of pomegranate juices. *Food Chem*, Volume 138(2–3): 1810–1818, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.100.
- Uljas, H.E., Ingham, S.C. (1998). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Synthetic Gastric Fluid after Cold and Acid Habituation in Apple Juice or Trypticase Soy Broth Acidified with Hydrochloric Acid or Organic Acids. *J Food Prot*, 61(8): 939–947, doi:10.4315/0362-028X-61.8.939.
- Vegara, S., Marti, N., Mena, P., Saura, D., Valeri, M. (2013). Effect of pasteurization process and storage on color and shelf-life of pomegranate juices. *LWT - Food Sci Technol*, 54(2): 592–596, doi: 10.1016/j.lwt.2013.06.022.
- Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V. (2008). Juice associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *J Food Prot*, 71(2): 356–364, doi: 10.4315/0362-028X-71.2.356.
- Williams, R.C., Sumner, S.S., Golden, D.A. (2005). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in Apple Cider and Orange Juice Treated with Combinations of Ozone, Dimethyl Dicarbonate, and Hydrogen Peroxide. *J Food Sci*, 70(4): 197–201, doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07188.x.

Zarfeshany, A., Asgary, S., Javanmard, S.H. (2014). Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res*, 3:100, doi: 10.4103/2277-9175.129371.

Zhao, T., Doyle, M.P., Besser, R.E. (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl Environ Microbiol*, 59(8): 2526–2530.



GIDALARDA BULUNAN KÜFLERİN TANIMLANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

İlkim Emenli, Gülten Tiryaki Gündüz*

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

Geliş / Received: 18.02.2019; Kabul / Accepted: 13.07.2019; Online baskı / Published online: 25.07.2019

Emenli, İ., Gündüz, G.T. (2019). Gıdalarda bulunan küflerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler. *GIDA* (2019) 44 (4): 692-706 doi: 10.15237/gida.GD19044

Emenli, I., Gunduz, G.T. (2019). Methods for identification of molds in foods. GIDA (2019) 44 (4): 692-706 doi: 10.15237/gida.GD19044

ÖZ

Küfler doğada hava, toprak, su ve organik maddeler üzerinde yaygın olarak bulunabilen mikroorganizmalardır. Küfler tarafından üretilen toksik metabolitler nedeniyle, küflerin insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır. Küfler gıdaların bozulmasına neden olarak ekonomik kayıplara da sebep olmaktadır. Gıdalarda gelişen küflerin tanımlanması dirençli türler, mikotoksijenik türler ve küf gelişiminin inhibisyonu gibi konularda çalışmalar yapılmasında gereklidir. Küflerin tanımlanması koloni morfolojisi ve mikroskopik özelliklerinin belirlenmesine dayanan geleneksel yöntemler ile gerçekleştirilmektedir. Geleneksel yöntemlerin zaman alıcı olması ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle, daha hızlı ve güvenilir yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Hızlı yöntemlerin maliyeti yüksek olup, aynı zamanda veri tabanlarının yetersiz olması nedeniyle kapsamlı araştırmalar ile standartlaştırılması gerekmektedir. Geleneksel ve hızlı yöntemlerin birlikte kullanılması çalışmaların doğruluğunu arttırmaktadır. Bu derleme çalışmasında, küflerin tanımlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler, moleküler yöntemler, matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ve fourier transform infrared spektroskopisi (FT-IR) yöntemleri incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Küf, tanımlama yöntemleri, MALDI-TOF, FT-IR, moleküler tanımlama

METHODS FOR IDENTIFICATION OF MOLDS IN FOODS

ABSTRACT

Molds are ubiquitous microorganisms in nature found on air, soil, water and organic matter. Molds can adversely affect the health of humans and animals by producing toxic metabolites. Molds also cause spoilage of foods which results in economic loss. Identification of molds grown in foods is crucial for the studies on inhibition of mold growth on foods, knowledge of resistant and mycotoxigenic species. Conventional identification procedures are based on the recognition of the colony morphology and microscopic observations. Since traditional identification procedures are time consuming and require specified personnel, there is a need for more rapid and reliable techniques to identify molds. Rapid methods are expensive and need to be standardized with extensive studies due to insufficient databases. Combination of conventional and rapid methods increases the accuracy of the studies. In this review, conventional, molecular, matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) methods used to identify molds were investigated.

Keywords: Molds, identification methods, MALDI-TOF, FT-IR, molecular identification

* Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author:

✉ gtgunduz@gmail.com ; gulten.tiryaki.gunduz@ege.edu.tr ☎ (+90) 232 311 30 03 📠 (+90) 232 311 48 31

GİRİŞ

Küfler, glukan ve kitin içeren hücre duvarına sahip, ökaryotik, doğada yaygın olarak bulunan önemli bir mikroorganizma grubu olup; tarım, tıp, gıda, ilaç ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda çeşitli sorunlara yol açmaktadır (Lecellier vd., 2014; Lima ve Santos, 2017). Özellikle karbonhidrat, protein, yağ ve nem açısından zengin olan gıdalar, küfler için yaşam alanı oluşturmaktadır. Küfler, mikrobiyel aktivite sonucunda gıdaların bozulmasına, gıda atıklarının oluşmasına yol açtığı ve ekonomik kayıplara sebep olduğu için gıda endüstrisi ve tüketiciler için önemli bir sorundur (Garnier vd., 2017).

Küfler, tarım ve gıda endüstrisinde hammaddelerin ve işlenmiş gıdaların bozulmasından sorumludur ve mikotoksin üretebilmelerinden dolayı ciddi sağlık riskleri oluşturabilmektedir (Lecellier vd., 2014). Mikotoksin, küfler tarafından üretilen toksik özellikteki ikincil bileşiklerdir (Heperkan, 2014). İngiltere'de 1960 yılında 100000 hindinin ölümüne sebep olan "Turkey X disease" olarak adlandırılan salgın sonrasında, toksik metabolitlerin üretebilmesinden dolayı küflerin insan ve hayvan sağlığı için tehlike oluşturduğu bilincine varılmıştır (Heperkan, 2014; Jiang vd., 2016). Küfler tarafından üretilen mikotoksinler, gıdanın küflü kısımlardan diğer kısımlarına difüze olabilmektedir. Küfler, bozulma etkeni ve kalite kaybına sebep olmasının yanı sıra kontrollü koşullarda kullanıldıklarında; organik asit, protein, antibiyotik ve pigment gibi ikincil metabolitleri üretme yeteneklerinden dolayı tıp ve gıda endüstrilerindeki uygulamalarda kullanılmaktadır (Wakai vd., 2017). Küflerin tanımlanması ile yararlı özelliklerinin keşfedilmesi de mümkün olabilmektedir.

Gıda bozulmaları ile ilişkili başlıca fungal gruplar, zerofilik, ısıya dayanıklı, koruyucu maddelere dayanıklı, anaerobik ve psikrofilik küflerdir (Rico-Munoz vd., 2018). Gıda güvenliği açısından en önemli küfler *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* spp.'dir (Bhunja, 2018).

Gıdalarda küf gelişiminin inhibisyonu, dirençli türlerin belirlenmesi, mikotoksin üreten ve

bozulmaya neden olan türlerin tanımlanması ve küflerin özelliklerinin araştırılması önemlidir (Houbraken ve Samson, 2017). Küflerin geleneksel olarak tanımlanması, koloni morfolojisi ve mikroskopik özelliklerinin belirlenmesine dayanmaktadır. Bu nedenle küflerin tanımlanması zaman alıcıdır ve deneyimli laboratuvarlarda bile hatalı sonuçlara ulaşılabilmektedir (Angeletti, 2017). Son yıllarda, küflerin tanımlanması için kültür bazlı olmayan yöntemlerin kullanılması yönünde çalışmalar hız kazanmıştır. Moleküler yöntemler, küflerin tür seviyesine kadar tanımlanması için uygun standartlara sahiptir. Bu yöntemler doğru sonuçlar verebilmesine rağmen, özel ekipman veya uzmanlık gerektirir ve maliyeti yüksektir (Sanguinetti ve Posteraro, 2017; Wattal vd., 2017). Rutin olarak küflerin tanımlanması için gereken sürenin azaltılması gıda sektörünün yanı sıra klinik olarak hastalıklara çözüm bulunabilmesi açısından da önemlidir (Gautier vd., 2014). 2000-20000 Dalton'luk kütle aralığındaki ribozomal proteinlerin analizine dayanan Matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemi; bakteri, küf ve mayaları geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında daha kısa bir süre içinde doğru bir şekilde tanımlamak için uygun bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Wattal vd., 2017). Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi genellikle gıda endüstrisinde ve bilimsel araştırmalar kapsamında şeker, asit vb. gibi kimyasal içeriğin belirlenmesi, gıdaların bozulması, bakteri ve fungi gibi mikroorganizmaları sayılarının belirlenmesinde ve tanımlanmasında kullanılmaktadır (Kandpal ve Cho, 2014)

Bu çalışmada, küflerin geleneksel, moleküler, MALDI-TOF ve FT-IR gibi yöntemler ile tanımlanmasıyla ilgili yapılan çalışmaların araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında yöntemler, kullanılan cihaz gibi konular hakkında bilgi verilerek, yapılan çalışmalar derlenmiştir.

Küflerin Klasik/Geleneksel Yöntemler ile Tanımlanması

Funguslar, dünyadaki en geniş organizma gruplarından biri olup, yapılan tahmini değerlendirmelere göre 1.5-3 milyon türü olduğu ifade edilmektedir. Moleküler yöntemlerin gelişmesi ile birlikte yaklaşık 100000 tanımlanmış tür bulunmaktadır. Gıda ve içecek endüstrisinde 50'sine sıklıkla rastlanmaktadır (Hawksworth, 2015). Fungal türlerin tanımlanması için en eski yöntem, başta üreme yapıları olmak üzere morfolojik özelliklerin belirlenmesidir. Fakat üreme yapısı geliştirmemiş fungal kültürler ya da farklı türlerin üyeleri arasındaki morfolojik benzerlikler nedeniyle tanımlamada sınırlamalar bulunmaktadır (Santos vd., 2010).

Gıdalarda bulunan küflerin tanımlanması için "Fungi and Food Spoilage" (Pitt ve Hocking, 2009) ve "Food and Indoor Fungi" (Samson vd., 2010) sıklıkla yararlanılan iki kitap olarak bilinmektedir. Araştırılan tür bu kaynaklarda bulunamazsa, daha geniş mikolojik literatürlere başvurmak gerekmektedir (Hawksworth, 2015). Hiflerin yapısı, septa ve spor varlığı, spor şekli, boyutu, çapı vb. gibi mikroskopik özellikler ile koloni görünümü (düz, balmumu, kadife, pamuk vb.), koloni büyüklüğü, koloni çapı, yüzeyin durumu (basık, kümelenmiş, çatlaklı vb.), yüzeyde ve besiyerinin altında görülen renk gibi makroskopik özellikler de incelenmektedir (Pitt ve Hocking, 2009).

Geleneksel yöntem kullanılarak küflerin tanımlandığı çalışmalar incelendiğinde bazılarında cins düzeyinde tanımlama yapılmışken, bazı çalışmalarda tür düzeyine kadar tanımlanmıştır. Küflü peynir yüzeyindeki küflerin izole edildiği ve morfolojik olarak tanımlandığı bir çalışmada *Penicillium commune*, *Penicillium roqueforti* ve *Penicillium verrucosum* türlerinin özellikle baskın olduğu bunun yanı sıra *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum* ve *Penicillium chrysogenum*'un da içinde bulunduğu 24 farklı türün tanımlandığı rapor edilmiştir (Hayaloğlu ve Kırbağ, 2007). Taze bufalo sütü, yoğurt, tereyağı ve peynirde bulunan 21 cins ve 59 türe ait olan küflerin makroskopik ve mikroskopik özelliklerine bakılarak tanımlandığı çalışmada, tüm süt ürünlerinden

izole edilen küflerin *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mucor* ve *Penicillium*'a ait olduğu rapor edilmiştir (Moubasher vd., 2018).

Çalışmalarda tüketime hazır gıdaların yanı sıra; ekipman, hava ve ambalaj gibi gıda ile temas eden ortamlarda küf analizleri yapılmakta ve bu küfler tanımlanabilmektedir. Peynir fabrikasında hava, plastik, salamura, süt ve ekipmanın örneklem olarak kullanıldığı çalışmadan alınan izolatlar tür düzeyinde tanımlanmış ve *P. brevicompactum*, *Geo. candidum*, *P. commune*, *P. palitans*, *P. solitum*, *P. roqueforti* türlerinin baskın olduğu belirlenmiştir (Kure vd., 2004). Mikroskopik ve makroskopik özelliklerin incelenerek küflerin tanımlandığı bazı benzer çalışmalar Çizelge 1'de belirtilmiştir.

Küflerin klasik yöntemle tanımlanması, ekim yapılması, inkübasyon süresi ve mikroskopik incelemeler nedeniyle zaman alıcı olup, sonuçlar gözlemlenen makromorfolojik ve mikromorfolojik karakterlerin yorumlanma şeklinden etkilenebilmektedir (Fischer vd., 2006). Biyokimyasal ve moleküler karakterlerin fungal taksonomiye dahil edilmesi, bu gibi problemleri çözmek için yardımcı olması adına önemli olmaktadır (Santos vd., 2010). Bir organizmanın karakterizasyonu için ne kadar fazla özellik kullanılırsa, yakından ilişkili türler daha doğru olarak ayırt edilebilmektedir (Fischer vd., 2006). Kültürel yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda, moleküler tabanlı yöntemlerin kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır.

Küflerin Moleküler Yöntemler ile Tanımlanması

Mevcut fenotipik yöntemler tüm türlerin doğru bir şekilde ayırt edilebilmesi için elverişli değildir ve bu nedenle tanımlamada moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (Criseo vd., 2015). Fenotipik olarak ayırt edilemeyen küf izolatları, ribozomal RNA (rRNA) veya diğer protein kodlayıcı genlerin DNA dizi analizi ile tanımlanabilmektedir (Cassagne vd., 2011). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak yapılan DNA tabanlı yöntem ile küflerin hızlı, hassas ve spesifik olarak tespiti yapılabilmektedir (Jedidi vd., 2018). Funguslara ait genom dizisinin ilk olarak *Neurospora crassa* için Galagan vd. (2003)

tarafından belirlendiği, daha sonra *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus oryzae*'nin genom dizilerinin belirlendiği ve karşılaştırıldığı rapor edilmiştir (Wakai vd., 2017). Gıdalarda bulunan küflerin moleküler yöntemler ile tanımlanmasında PZR tekniği ve RNA dizi analizi (RNAseq) teknikleri kullanılmaktadır.

RNAseq tekniğinin kullanılabilmesi için yeterli miktarda ve saflıkta küf RNA'sının gıdadan izole edilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda küf RNA'sı değişime uğramamış olmalı ve RNA izolasyonunu tehlikeye atabilecek proteinlerden, enzimlerden ve polisakkaritler gibi bileşiklerden arındırılmış olmalıdır (Bernáldez vd., 2017).

Çizelge 1. Küflerin makroskobik ve mikroskobik tanımlanmasına dair çalışmalar

Gıda	Tanımlanan küf	Referans
Hindistan cevizi	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Penicillium italicum</i>	Shehu ve Tafinta, 2017
Kakao	<i>Aspergillus tamarii</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. japonicus</i> , <i>Fusarium chlamyosporum</i> , <i>Syncephalastrum racemosum</i>	Fapohunda vd., 2018
Sucuk	<i>Scopulariopsis chartarum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>P. jensenii</i>	Çavuş vd., 2018
Ananas, Karpuz, Portakal, Papaya	<i>A. niger</i> , <i>Fusarium avenaceum</i> , <i>P. digitatum</i> , <i>R. stolonifer</i> , <i>Fusarium solani</i>	Mailafia vd., 2017
Mısır'a özgü sert peynir	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. flavipes</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Mucor</i> spp., <i>R. stolonifer</i>	El-Fadaly vd., 2015
Soğan	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp.	Ushasri ve Kumar, 2018
Kırmızı biber	<i>R. stolonifer</i> , <i>A. niger</i> , <i>Fusarium solanii</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Geo. candidum</i> , <i>Mucor pusillus</i>	Fatimoh vd., 2017
Biberiye	<i>Aspergillus</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	Garcia vd., 2018

DNA bazlı yöntemler tür düzeyinde tanımlama sağlayan hassas bir metot olup, aynı zamanda taksonomik ve biyoçeşitlilik hakkındaki araştırmalara önemli katkılar sağlamaktadır (Dulla vd., 2016). Gıdalarda bulunan küf biyoçeşitliliğinin belirlenmesinde ve taksonomik çalışmalarda her bir izolat için dizi analizlerinin yapılmasında, öncelikli olarak aynı olanların gruplandırılarak seçilen izolatlardan dizi analizi yapılması daha pratik ve ekonomiktir (Srivastava vd., 2017). Bu amaçla, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PZR) ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PZR) gibi moleküler belirteçler yaygın olarak kullanılmaktadır. RAPD-PZR yönteminde polimorfik DNA'nın seçilmiş bir primer ile rastgele çoğaltıldıktan sonra, agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen RAPD profillerinin görüntülenmesi suretiyle türler gruplandırılır

(Surženko vd., 2017). RFLP-PZR yönteminde ise, rDNA'nın ITS bölgeleri evrensel primer ile çoğaltılıp uygun restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra jel elektroforezi ile bantlar görüntülenmektedir. Aynı bant görüntüsüne sahip izotlar gruplandırılmaktadır. Ruiz-Moyano vd (2009) tarafından yapılan çalışmada tütsülenmiş toz biberdeki küflerin RFLP-PZR yöntemi ile tür düzeyinde tanımlama için kullanılabileceği ifade edilmiş, ancak daha doğru tanımlama için ITS bölgelerinin dizi analizi yapılmıştır. RFLP-PZR yöntemi ile ayırt edilemeyen *P. expansum*, *Penicillium griseofulvum* veya *Penicillium raistrickii* olabileceği ifade edilen izolatların *P. raistrickii* olduğu dizi analizi ile doğrulanmıştır.

Çalışmalarda genellikle fungal patojenlerin tespitinde duyarlılığı arttırmak için evrensel fungal PZR primerleri geliştirilmektedir. DNA'nın PZR amplifikasyonu ve ardından elde edilen

amplikonların dizilimi küfler için moleküler tanımlama adına en çok gelişme vaad eden yaklaşım olarak gösterilmektedir. Özellikle İnternal Ara Bölgeler (Internal Transcribed Spacer, ITS) bölgelerinin, küflerin filogenetik sınıflandırılması için faydalı olduğu belirtilmektedir (Raja vd., 2017). Fungusların tanımlanmasında, belirli bir izolatanın kimliğini belirleyen bir DNA sekansını esas alan ve sıklıkla da nükleer ribozomal ITS'in evrensel fungal kısa bir DNA sekansını (barkod) kullanan analizler uygulanmaktadır (Drissner ve Freimoser, 2017). Küflerin moleküler olarak tanımlanmasında ribozomal (ITS1, ITS2 ve 26S rRNA geninin D1/D2 bölgeleri) ve ribozomal olmayan (β -tubulin ve EF1 α genleri) hedef bölgeler çoğaltılmaktadır (Panelli vd., 2012). ITS bölgesine dayanan tanımlama prosedürleri daha yaygın olarak kullanılmakta olup; ribozomal genin çoklu kopyalarının tüm organizmalarda bulunması sebebiyle PZR ile hassas bir şekilde belirlenebilmesi, ITS bölgesindeki sekans değişkenliği ve yüksek oranda korunmuş olması nedeniyle yakından ilişkili türlerin ayırımına izin vermesi çalışmalarda ITS bölgelerinin tercih edilme sebepleri olarak bildirilmektedir (Trabelsi vd., 2019). Moleküler tanımlama veritabanında D1-D2 bölgesinden kapsamlı olarak yararlanılmaktadır. D1-D2 bölgeleri bazen ITS1 veya ITS2 sonuçlarının doğrulanmasında kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda da özellikle ITS bölgeleri tercih edilmektedir; Pinheiro vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada benzer özelliklere sahip *Aspergillus* türlerinin tanımlaması genomun 25-28S bölgesinin D1-D2 bölgeleri yerine ITS dizileri kullanılarak elde edilmiştir. Yaklaşık 2500 tür hakkında referans dizileri bulunmaktadır. Ticari olarak bulunan DNA izolasyon kitleri ile miselyumdan ve sporlardan DNA ekstrakte edilebilmektedir (Hawksworth, 2015). Genomun standart bir bölümünden barkod elde edilip, bu sekansın referans barkod dizilerinden oluşan kütüphane ile karşılaştırılması sonucu tanımlama gerçekleşmektedir (Dulla vd., 2016). Moleküler yöntemler genellikle nükleik asitlerin sekanslarındaki farklılıkların saptanmasına dayanmaktadır. PZR'ın temel avantajı, mikroorganizmaların kültüre edilmeden tanımlanabilmesidir. Genetik yöntemler ile hızlı

bir şekilde ve spesifik olarak birbirine yakın türler arasında tanımlama yapılabildiği belirtilmiştir (Hertwig vd., 2018). Özdeş ITS sekanslarının, *Aspergillus*'un bazı türlerinde olduğu gibi iki veya daha fazla farklı tür tarafından paylaşılacağı göz önünde bulundurulmalıdır (Hawksworth, 2015). Bu nedenle farklı primerler kullanılarak tanımlamalar doğrulanmaktadır. Küflerin tanımlanmasında kullanılan DNA dizi analizlerinin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Küf kültürlerinin lize edilmesi nispeten zor olduğu için DNA ekstraksiyon verimi az olabilmekte, ayrıca PZR amplifikasyonu, küf kültürlerinde PZR inhibitörlerinin varlığından dolayı başarısız olabilmektedir (Cassagne vd., 2011). Moleküler tanımlamada fazla veri üretilmesi ve bu verilerin depolanması genellikle sınırlayıcı bir durumdur, aynı zamanda DNA dizimleri için kütüphanelerinin hazırlanması ve kalite kontrolü zaman alıcı ve masraflı olabilmektedir (Drissner ve Freimoser, 2017).

Garnier vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada, tereyağı, krema, peynir, yoğurt örneklerinden ve üretim ortamlarından alınan toplam 175 izolatta ITS4, ITS5, Bt2a, Bt2b, EF1-728F, EF1-986R, cmd5, cmd6 primerleri kullanılarak tanımlanan küflerden *P. commune*, *Penicillium bialowiezense*'e en çok rastlanırken, *Penicillium antarcticum*, *Penicillium salamii*, *Cladosporium phyllophilum* süt ürünlerinde ilk defa tanımlanmıştır. Kurutulmuş balık örneğinden izole edilen küflerin moleküler olarak tanımlandığı çalışmada, dizi analizi sonucunda kurutulmuş balıklarda *Aspergillus flavus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. sydowii*, *A. rugulosa*, *A. niger*, *A. foetidus*, *Lichttheimia ramosa* ve *Curvularia lunata*'nın bulunduğu rapor edilmiştir (Sivaraman vd., 2018).

Genellikle içecekler ile temas eden buz küplerindeki küflerin incelendiği çalışmada bütün örneklerde küf tespit edilmiştir. Seçilen kolonilerin fenotipik ve genotipik karakterizasyonu belirlenirken 9 küf izolatu moleküler olarak tanımlanmıştır. ITS1/ITS4 primerleri kullanılarak tanımlanan küfler; *Fusarium* spp., *Fusarium solani*, *Hansfordia* spp. *Paecilomyces* spp., *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium glabrum*, *Phoma leveillei*, *Purpureocillium* spp., *Thanatephorus cucumeris* olarak rapor edilmiştir (Francesca vd., 2018).

Diğer bir çalışmada, farklı moleküler yöntemler uygulanmış ve 39 izolatin 16 farklı suştan oluştuğu rapor edilmiş, RAPD-PZR analizi ile elde edilen profillerin, *Geo. candidum*'un tür içinde ayrılmasında ve farklı türlerin suş düzeyinde karakterizasyonu için kullanılmasına uygun olduğu bildirilmiştir (Sacristán vd., 2013).

Çavdar ekmeklerinin bir ay boyunca plastik ambalajda tutulduğu ve ekmek yüzeylerinden farklı morfolojiye sahip küflerin izole edildiği çalışmada, RAPD-PZR yöntemi ile M13 primeri kullanılarak 50 fungal izolat elde edilmiş ve tanımlanmıştır. Tanımlanan küfler *Aspergillus chevalieri*, *A. flavus/oryzae*, *A. niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Penicillium citrinum*, *P. corylophilum* olarak rapor edilmiştir. β -tubulin geninin ve ITS bölgesinin dizilişi, *Penicillium* türlerinin tanımlanması için eşit bir etkinlik gösterirken, sadece β -tubulin geninin sekansı, benzer özellikteki *Aspergillus* türleri de dahil olmak üzere çoğu izolatin tanımlanmasını sağlamıştır (Surženko vd., 2017).

Zhao vd. (2018)'in araştırmasında, topraktan izole edilen küfün koloni görünüşü, dokusu, rengi gibi morfolojik özellikleri CYA (Czapek Yeast Agar) ve MEA (Malt Extract Agar) besiyerinde, ardından spor yapılarını gözlemek için de mikroskop altında incelenmiştir. Suş, daha sonra *Aspergillus* için taksonomik kılavuzlar kullanılarak tanımlanmıştır. ITS, β -tubulin ve kalmodulin genleri baz alınarak moleküler olarak da tanımlanmış ve suşun *Aspergillus tubingensis* QF05 olduğu rapor edilmiştir.

244 izolatin sekans analizinin yapıldığı çalışmada ise, 19 izolatin ITS verileri elde edilemediği için 225 izolat için fenotipik yöntem ile sekans analizi karşılaştırılmıştır. Fenotipik tanımlama ile sekans bazlı karşılaştırmada, sekans analizinin, izolatların %52'sinde daha kesin sonuçlar verdiği, izolatların %38.60'ında, her iki yöntemin de sonuçlarının uyumlu olduğu rapor edilmiştir (Ciardo vd., 2007). Diğer bir çalışmada, Cabrales İspanyol peynirinin olgunlaşması sırasında baskın olan küfler morfolojik ve genotipik olarak tanımlanmış, çalışmada morfolojik olarak 12 izolat *Penicillium* spp., 11 izolat *Penicillium roqueforti*, 10 izolat *Geo.*

candidum, 1 adet *Acremonium charticola*'nın tanımlandığı ve tanımlanamayan bir izolatin olduğu rapor edilmiştir. ITS bölgelerinin kullanıldığı moleküler analizde, *Penicillium* türlerinin 5 adeti *P. commune*, 4 adeti *P. chrysogenum*, 2 adeti *P. roqueforti* ve 1 adeti *P. citreonigrum* olarak tanımlanmıştır (Flórez vd., 2007). Çizelge 2'de gıdalardan izole edilen küflerin moleküler yöntemler ile tanımlanmasında kullanılan primerler ve tanımlanan küfler özetlenmiştir.

Küflerin MALDI-TOF Yöntemi ile Tanımlanması

Proteomik analiz, hücresel proteinlerin küresel değerlendirmesi olarak tanımlanmaktadır (Kim vd., 2007). Son yıllarda, kromatografik ve hatta DNA'ya bağlı metotlara alternatif olarak, proteomik yaklaşım kullanılarak mikrobiyel türün tanımlanmasını hedefleyen yöntemlerden olan MALDI-TOF MS yöntemi, her fungal taksonun karakteristik bir spektrumunu üretmek için mikoloji alanında uygulanmaktadır (Oliveira vd., 2015; Panda vd., 2015). MALDI-TOF MS 1980'lerde geliştirilmiş olup, moleküllerin iyonlaşmasıyla organik bileşiklerin molekül kütlelerini belirlemek için yapılmaktadır (Miguel vd., 2017). MALDI-TOF MS'de bütün veya parçalanmış proteinler, kristalize matris varlığında bir lazer ile iyonize edilerek elektrik alana tabi tutulmaktadır (Kim vd., 2007). Bu yöntem 2000-20000 Dalton kütle aralığındaki proteinlerin ölçümüne dayanan tekrarlanabilir bir yöntemdir (Oliveira vd., 2015). MALDI-TOF MS, bakteri ve küf-mayaları birkaç dakika içinde doğru bir şekilde tanımlayabilen bir yöntemdir (Wattal vd., 2017). Tanımlama, protein dizisinin veritabanındaki teorik peptitler ile karşılaştırılmasına (hücrelerin peptit kütle parmak izlerine, peptid mass fingerprints) dayanmaktadır (Kim vd., 2007; Lüthje vd., 2017). Fungusların kütle spektrometrik peptid/protein profilleri, 1000-20000 m/z (kütle/yük) bölgesindeki moleküler iyon pikleri verir; burada biyomarker iyonlarının oluşturduğu set, örneklerin cins, tür veya suş seviyesinde farklılaşmasını kolaylaştırmaktadır (Chalupová vd., 2014). Referans spektrumlarla eşleşen ve mikroorganizmanın tanımlanmasını sağlayan her mikroorganizma için tipik bir

spektrum (MS parmak izi) oluşturulmaktadır (Panda vd., 2015).

Çizelge 2. Küflerin moleküler olarak tanımlanmasına dair çalışmalar

Gıda	Moleküler yöntem	Kullanılan Primerler	Tanımlanan Küfler	Referans
Çavdar ekmeği	RAPD-PCR β-tubulin geni dizi analizi	M13 Bt2a, Bt2b	<i>Aspergillus chevalieri</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. tubingensis</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. corylophilum</i>	Surženko vd., 2017
Armada peyniri	RAPD-PCR ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi dizi analizi	M13 ITS4, ITS5	<i>Geo. candidum</i> , <i>Geo. candidus</i>	Sacristán vd., 2013
Tütsülenmiş domuz pastırması	ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi dizi analizi	ITS1, ITS2	<i>Cladosporium oxysporum</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>	Alía vd., 2016
Fıstık	ITS bölgesi dizi analizi	ITS1, ITS4	<i>A. flavus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. niger</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Penicillium spp.</i>	Jogee vd., 2017
Parmesan	ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi dizi analizi	ITS1, TW13	<i>C. cladosporioides</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. camemberti</i>	Banjara vd., 2015
Sofralık zeytin	β-Tubulin ve ITS bölgeleri dizi analizi	ITS4/ITS5, Bt2a/Bt2b	<i>P. crustosum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. polonicum</i> , <i>P. commune</i>	Bavaro vd., 2017
Tütsülenmiş sosis	β-Tubulin ve ITS1-5.8S-ITS2 rRNA bölgeleri dizi analizi	Bt2a, Bt2b, ITS1, ITS4	<i>C. cladosporioides</i> , <i>Cladosporium uredinicola</i>	Lozano-Ojalvo vd., 2015
Tütsülenmiş toz biber	PZR-RFLP 5.8S-ITS bölgesi dizi analizi	ITS1, ITS4 ITS4, ITS5	<i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>P. raistrickii</i>	Ruiz-Moyano vd., 2009
Şeker kamışı	PZR-RFLP	ITS4, ITS5	<i>Colletotrichum falcatum</i> , <i>Fusarium moniliiforme</i> , <i>Trichoderma viride</i>	Srivastava vd., 2017
Ananas	PZR-RFLP Dizi analizi	ITS1, ITS4, ITS5 ITS1, ITS4	<i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Geo. candidum</i> , <i>Neurospora tetrasperma</i>	Fulgence vd., 2019
İncir	PZR-RFLP ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi dizi analizi	ITS1, ITS4 ITS1, ITS4	<i>C. cladosporioides</i> , <i>Penicillium corylophilum</i> , <i>A. alternata</i>	Villalobos vd., 2017

MALDI-TOF MS metodolojisi nispeten az sayıda (10^6 - 10^7) mikrobiyel hücre gerektirir (Oliveira vd., 2015). Tanımlanacak örneği cihaza yerleştirmeden önce proteinlerin elde edilmesi için gerçekleşen ekstraksiyon prosedürü çalışmadan çalışmaya değişiklik gösterebilmektedir. Genel olarak küf üremesi tamamlandıktan sonra bulaşmaları önlemek için etanol içerisinde bekletilerek küfler inaktive edilmekte ve ardından proteinlerin elde edilmesi için asetonitril ve formik asit içeren solüsyon uygulanmaktadır (Luethy ve Zelazny, 2018). Numune hazırlama prosedürü, uygun bir matris bileşiği seçimi, numune yerleştirme teknikleri gibi işlemlerde bu özelliklerin dikkate alınarak çeşitli yaklaşımların geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Chalupová vd., 2014).

Numune ekstraksiyon prosedürüne yeterli dikkat gösterilerek ve referans kütüphanedeki her bir türü temsil eden kütle spektrumlarının sayısı artırılarak MALDI-TOF'un küflerin tanımlamasında kullanımı geliştirilebilmektedir (Angeletti, 2017).

MALDI-TOF MS platformları 2004'ten beri, farklı ticari firmalar tarafından piyasaya sürülmektedir. MALDI-TOF MS kullanılarak küflerin tanımlanması, bakteri ve maya tanımlamalarından daha zor olup, küf kolonileri spor, miselyum gibi farklılaşmış yapılardan oluştuğu için tekrarlanabilir spektrumların elde edilmesini engellemektedir (Cassagne vd., 2016). Küf izolatlarında hif ve konidial yapılar bir arada

bulunabildiği için küflerin MALDI-TOF MS spektrumları yavaş elde edilebilmektedir. Bu yüzden bir fungal izolattan üretilen MALDI-TOF spektrumu, referans veri tabanındaki spektrum ile her zaman tamamıyla eşleşemeyebilmektedir (Angeletti, 2017). Bakteri tanımlaması oldukça ilerlemiş olmasına rağmen diğer mikroorganizmaların biyotiplendirilmesi hala gelişme aşamasındadır (Stübiger vd., 2016). MALDI-TOF MS klinik laboratuvarlarda patojenlerin doğru, hızlı ve ekonomik tanımlanması için standart bir araç haline gelmiştir. Bu yüzden metot sürekli olarak iyileştirilmekte ve suşların ayırt edilmesi, metabolitlerin veya antibiyotik direnci gibi fonksiyonel karakteristiklerin belirlenmesi için sürekli yeni uygulamalar geliştirilmektedir. Bunun yanı sıra tarım, gıda güvenliği ve kalite testleri veya ekoloji alanı gibi disiplinlerde de bu yöntemin benimsenmesi için araştırmalar yapılmaktadır (Drissner ve Freimoser, 2017). Maliyet etkinliği, kısa analiz süresi, düşük hata oranı ve aynı zamanda yakın ilişkili türler arasında ayırım yapabilme özelliği MALDI-TOF'u rutin analizlerde kullanılmaya uygun hale getirmektedir. Tekniğin dezavantajı, kültürlerin önceden izole edilmiş ve saflaştırılmış olması olup, gıda vb. matrikslerde direkt olarak uygulanamamasıdır (Hendrickx, 2017).

MALDI-TOF MS kullanılarak 88 maya ve 37 küf izolatının tanımlandığı bir çalışmada, MALDI-TOF MS ile klasik tanımlama arasındaki korelasyon tüm izolatlar (125) için cins seviyesinde %90.40 ve tür seviyesinde %87.20 olarak bildirilmiştir. MALDI-TOF MS ile küflerin %10.81'inin cins seviyesinde, %56.70'sinin de cins ve tür seviyesinde tanımlandığı da rapor edilmiştir. Numune hazırlama protokolünde yapılan değişiklik ile belirlenen yüzdelerin cins ve tür bazındaki tanımlama yüzdesi %86.40 olarak iyileştirilmiştir. Numune hazırlığından başlayarak tanımlamaya kadar geçen toplam sürenin 23 dakika olması araştırmacılar tarafından diğer yöntemlere alternatif bir özellik olarak belirtilmektedir (Panda vd., 2015).

Gıdalarda sıklıkla rastlanan *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Mucor* spp. ve *Fusarium* spp.'nin arasında olduğu ve standart bir ekstraksiyon

protokolünün uygulandığı çalışmada, 136 türe ait 618 fungal suştan 6477 spektrum elde edilmiştir. Veritabanı kullanılarak çapraz değerlendirilmiş ve %95 oranında türlerin doğru tanımlandığı rapor edilmiştir. Araştırmacılar MALDI-TOF yönteminin geleneksel yöntemlere alternatif olacağını bildirmektedir (Quéro vd., 2018).

Yapılan bir çalışmada, 262 izolatın tanımlanması için 347 türe ait 708 suşa karşılık gelen 2832 referans spektrumunu içeren referans spektrum kütüphanesi kullanılarak ulaşılan MALDI-TOF MS verileri, morfolojik olarak ve DNA bazlı tanımlama ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* ve *Aspergillus terreus* en sık rastlanan 4 tür olarak bildirilmiş ve DNA sekansına dayalı tanımlama, on izolattan sadece biri üzerinde gerçekleştirilmiştir. MALDI-TOF MS'nin uygulanması, küflerin tanımlanma düzeyini tür seviyesinde %78.20'den %98.10'a çıkarmış ve eksik tanımlama oranını %9.80'den %1.20'ye düşmesini sağlamıştır. MALDI-TOF MS ile 24 izolatın analizi için gereken sürenin yaklaşık 95 dakika olduğu bildirilmiştir. Morfolojik olarak tanımlamada gereken özelliklerin görülemediği genç kolonilerin MALDI-TOF MS ile doğru bir şekilde tanımlanabildiği rapor edilmiştir (Gautier vd., 2014). Geleneksel tanımlamanın MALDI-TOF MS ile karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada 58 türü içeren 625 küf izolatının, 501'inin (% 80) geleneksel olarak, 556'sının da (% 89) MALDI-TOF MS ile doğru olarak tanımlandığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, *Aspergillus* dışındaki türlerin tanımlanmasında, geleneksel yöntemle %30.6 oranında doğru tanımlama sağlanırken, MALDI-TOF yöntemi ile ise doğru tanımlama oranının %61.2 olduğu bildirilmiştir (Ranque vd., 2014).

MALDI-TOF MS ile 12003 izolatın tanımlandığı çalışmada, bakteri suşları için %97.70, mayalar için %92.80 ve küfler için de %80 oranında tanımlama gerçekleşmiştir. *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Fusarium solani*'ye ait 20 izolattan 16'sı tanımlanabilmektedir. Veri tabanlarında bulunmayan spektrumlar, kültürel koşullar, protein ekspresyonunun değişkenliği, iç kalibrasyonun başarısızlığı ve benzer proteinleri

ifade eden yakın ilişkili türlerin hatalara ya da hatalı tanımlamaya yol açabildiği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Wattal vd., 2017).

Küflerin tanımlanması için MALDI-TOF MS yönteminin kullanımındaki sınırlamalarından en önemlisi ticari olarak temin edilebilen veritabanlarının geniş olmamasıdır. Genişletilmiş MALDI-TOF MS veritabanlarının oluşturulması, emek ve mikolojik beceri gerektirmektedir. Bu nedenle, küfler için referans veri tabanını, veritabanında temsil bulunmayan rutin numune kültürlerinden türetilen küf türleri ile zenginleştirerek sürekli olarak güncellemek gerekmektedir. Yetersiz MALDI-TOF MS tanımlama sonuçlarının, referans veri tabanı oluşturma prosedürleri ile izolatların kütle spektrumunu elde etmek için olan prosedürler arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Sanguinetti ve Posteraro, 2017).

Küflerin FT-IR ile Tanımlanması

FT-IR, bir moleküldeki kimyasal bağ türlerini tanımlamak için kullanılan eski bir teknik olup, günümüzde dijitalleşmesiyle de kullanım açısından kolaylık sağlanmıştır (Santos vd., 2010). Endüstri, araştırma ve tıp bilimi gibi çoğu alanda FT-IR spektrometrelerin uygulamaları mevcuttur. Çok miktarda veri kısa sürede yüksek hassasiyetle analiz edilebilmektedir. FT-IR spektrometresi polimerlerin tanımlanmasında, hammaddelerin bileşiminin doğrulanmasında, yüzey analizlerinde, mikroorganizmaların tanımlanmasında, adli bölümlerde, kalite kontrol taramasında, biyomedikal alanında olmak üzere birçok alanda kullanılmakta olup, bu konuda ilerlemeler devam etmektedir (Vij, 2007). Gıdalarda bulunan mikroorganizmaların tanımlanması, makromoleküllerin yapısal analizi, organik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizi, maddelerin yapılarının aydınlatılması ve saflık kontrolü gibi birçok alanda FT-IR spektroskopisi kullanılmaktadır (Büyüksırt ve Kuleaşan, 2014).

Fenotipik ve genotipik yöntemlere dayalı fungusların rutin tanımlanması titiz çalışma gerektirmekte ve zaman alıcı olabilmektedir. FT-IR spektroskopisi küflerin hızlı bir şekilde tanımlanmasına olanak tanıyan yaklaşımlardandır

(Lecellier vd., 2014). FT-IR'ın temeli, bir numunedeki moleküller tarafından kızılötesi ışığın absorbe edilmesidir. Kızılötesi ışınları absorbe edildiğinde, molekül içindeki saptanabilir dipol değişikliklerinin her biri, kimyasal yapılarına bağlı olarak belirli frekans bölgelerinde gözlemlenebilmektedir (Oberle vd., 2015). Işın, numunedeki ışınlanan enerjinin miktarını kontrol etmek için bir odayı geçer. Kızılötesi ışını, spektral kodlamanın gerçekleştiği interferometreye girer; sonuçtaki interferogram sinyali interferometreden çıkar. Son olarak, ışın son ölçüm için dedektöre geçer ve ölçülen sinyal dijitalleştirilerek, Fourier dönüşümünün gerçekleştiği bilgisayara gönderilmektedir. Böylelikle spesifik "parmak izi" ifade etme kapasitesi sayesinde FT-IR spektroskopisinin spektral veri kütüphaneleri kullanarak bilinmeyen mikrobiyel suşların tanımlanması için kullanılmasına olanak tanımaktadır (Santos vd., 2010). İçeceklerden ve üretimde kullanılan ekipmanlarda tanımlanan küflerin, FT-IR ile karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Paecilomyces* ve *Phoma*'ya ait türlerin spektrumları elde edilmiştir (Shapaval vd., 2010).

Fransa ve Hollanda'da bulunun iki kültür koleksiyonundan temin edilen ve DNA dizilimi kullanılarak tanımlanan 131 suş için FT-IR spektroskopisi kullanılan bir çalışmada, elde edilen tanımlama seviyeleri cins bazında %98.97 ve tür bazında %98.77 olarak bildirilmiştir (Lecellier vd., 2014). Araştırmacıların diğer çalışmalarında ise, yine aynı iki kültür koleksiyonundan temin edilen 486 küf suşunun (43 cins ve 140 tür) önceden oluşturulan spektral veri tabanı kullanılarak FT-IR spektrumları belirlenmiştir. Elde edilen spektrumların %99.17'sinin cins ve %92.30'unun tür seviyesinde doğru tanımlandığı bildirilmiştir. Çalışma sonucunda, küflerin hızlı ve doğru olarak tanımlanmasında FT-IR spektroskopisinin alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Lecellier vd., 2015).

Gıda üretim hattı boyunca farklı kontrol noktalarından alınan numunelerden mikroorganizmaların izolasyonu ve saflaştırılmasının ardından besiyerinde

mikroorganizmaların geliştirilmesi ve üreme gösteren mikroorganizmaların mikropalakalarda geliştirilmesinden sonra FT-IR spektroskopisi aracılığıyla veri kütüphanelerinden yararlanılarak mikroorganizmaların tanımlanmasının mümkün olabileceği bildirilmiştir. Gıda üretim hattından *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Peyronellaea* ve *Phoma*'ya ait 20 adet küfün referans olarak seçildiği çalışmada, seçilen izolatların FT-IR spektroskopisi ile %80-100 aralığında doğruluk ile tanımlanabildiği rapor edilmiştir (Shapaval vd., 2017).

Genellikle bitkilerin bozulmasına neden olan *Fusarium* spp. ve *Pythium* spp.'ye ait toplam 20 türün FT-IR spektroskopisi ile incelendiği çalışmada analiz edilen küflerin her biri için tutarlı spektrumlar elde edilmiştir. 1800-1000 cm⁻¹ arasında değişen spektral alanda küfler arasında 1 saatte kolay ve güvenilir bir tanımlama sağlandığı rapor edilmiştir. FT-IR spektroskopisinin uygulanabilir, doğru ve hassas bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Erukhimovitch vd., 2005).

FT-IR, mikroorganizmalar gibi kimyasal olarak çok kompleks yapıların kompozisyonunu

karakterize etmek için kullanılabilir. Metabolit üretiminde farklılık gösteren bir taksonun suşları FT-IR spektroskopisi ile güvenilir şekilde ayırt edilebilmektedir. Bu yöntemin *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerini, tür ve suş seviyesinde tekrarlanabilir bir şekilde ayırt etmek için uygun olduğu bildirilmektedir (Fischer vd., 2006). Mikrobiyolojik FT-IR hızlı, etkili, reaktif içermez, tüm mikroorganizmalar için geçerlidir ve az miktarda biyokütle gerektirmektedir (Santos vd., 2010).

Küflerin mikroskobik ve makroskobik özelliklerini içeren klasik yöntemlerle tür düzeyinde tanımlanması oldukça zordur. Bifazik tanımlama olarak ifade edilen morfolojik, kimyasal ve moleküler özelliklerin birleştirilmesi ile elde edilen sonuçların kesin ve güvenilir olduğu belirtilmiştir (Decontardi vd., 2018). Küflerin tanımlanmasında kullanılan geleneksel yöntemler, moleküler yöntemler, MALDI-TOF MS ve FT-IR yöntemlerinin çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (Çizelge 3).

Çizelge 3. Küflerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması (Büyüksırt ve Kuleaşan, 2014; Cassagne vd., 2011; Lecellier vd., 2015; Jedidi vd., 2018)

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
Geleneksel yöntem	-Maliyeti düşüktür	-Deneyimli personele ihtiyaç duyulmaktadır. -Zaman alıcıdır. -Hassasiyeti düşük olup, tür düzeyinde tanımlanması zordur.
Moleküler yöntemler	-Hızlı, hassas ve tür düzeyinde spesifik olarak tespiti yapılabilmektedir.	-DNA veya RNA ekstraksiyonlarında sıkıntılar yaşanabilmektedir. -Maliyeti yüksektir. -Emek yoğunudur.
MALDI-TOF	-Basit, hızlı ve doğru sonuç alınır. -Makine yatırımı yapıldıktan sonra izolat başına maliyeti çok düşüktür. -Hata oranı düşüktür. -Yakın ilişkili türler arasında ayırım yapılabilir. -Deneyimli personele gerek yoktur.	-Geniş aralıktaki küflerin tanımlanması için veritabanı yetersiz kalmaktadır. -Kültürler önceden izole edilmiş ve saflaştırılmış olmalı, gıda vb. matrikslerde direkt olarak uygulanamaz. -Makine maliyeti yüksektir.
FT-IR	-Hızlı ve etkilidir. -Reaktif kullanımına gerek yoktur.	-Geniş aralıktaki küflerin tanımlanması için veritabanı yetersiz kalmaktadır.

SONUÇ

Gıdalardaki küflerden kaynaklanabilecek risklerin azaltılması, küf bulaşma kaynaklarının belirlenmesi ve mikotoksin üreten küflerin belirlenebilmesinin yanında, antibiyotik, renk pigmentleri, organik asit vb. ürünlerin üretiminde kullanılabilmesi için küflerin doğru bir şekilde tanımlanmaları önem arz etmektedir. Küflerin koloni morfolojisi ve mikroskopik özelliklerin incelenmesine dayalı klasik yöntemler tanımlamada tek başına yeterli değildir. Tanımlama işlemi, uzman laboratuvarında ve deneyimli kişiler tarafından yapılması gereken hassas ve emek gerektiren zaman alıcı bir süreçtir. Gıdalarda bulunan küflerin çok geniş bir çeşitlilik göstermesi nedeniyle, kültürel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlama yapılması deneyimli personel ile bile çoğu zaman mümkün olmamaktadır, bu nedenle günümüzde küflerin tanımlanmasında moleküler yöntemlerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Geleneksel mikolojik tekniklere ek olarak yararlanılan moleküler tabanlı ve proteomik yöntemler son zamanlarda geliştirilmeye devam etmektedir. Bunlardan bazıları basit PZR tabanlı yöntemler, gerçek zamanlı PZR, MALDI-TOF ve FT-IR gibi yöntemlerdir. Klasik yöntemlere ek olarak geliştirilen bu yeni yöntemler sayesinde bilimsel, endüstriyel ve halk sağlığı açısından da önemli olacak gelişmeler söz konusudur. Yeni yöntemler ile birlikte daha hızlı ve doğru sonuçlar ortaya konmaktadır. Buna rağmen optimizasyon süreci tamamlanana kadar çalışmalarda geleneksel yöntem, yeni yöntemler ile karşılaştırılarak ve/veya desteklenerek daha kesin sonuçlara ulaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

Alía, A., Andrade, M.J., Rodríguez, A., Reyes-Prieto, M., Bernáldez, V., Córdoba, J.J. (2016). Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry-cured ham. *Meat Sci* 122: 16-24, doi: 10.1016/j.meatsci.2016.07.007.

Angeletti, S. (2017). Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 138: 20-29.

Banjara, N., Suhr, M.J., Hallen-Adams, H.E. (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Curr Microbiol* 70(6): 792-800.

Bavaro, S.L., Susca, A., Frisvad, J.C., Tufariello, M., Chytiri, A., Perrone, G., Mita, G., Logrieco, A.F., Bleve, G. (2017). Isolation, characterization, and selection of molds associated to fermented black table olives. *Front Microbiol* 8: 1356, doi: 10.3389/fmicb.2017.01356.

Bernáldez, V., Rodríguez, A., Rodríguez, M., Sánchez-Montero, L., Córdoba, J.J. (2017). Evaluation of different RNA extraction methods of filamentous fungi in various food matrices. *LWT-Food Sci Technol* 78: 47-53.

Bhunja, A.K. (2018). Molds and Mycotoxins. In: *Foodborne Microbial Pathogens*, Springer, New York, NY, pp. 167-174.

Büyüksırt, T., Kuleaşan, H., 2014. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi ve gıda analizlerinde kullanımı. *GIDA* 39 (4): 235-241.

Cassagne, C., Normand, A.C., L'ollivier, C., Ranque, S., Piarroux, R. (2016). Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* 59(11): 678-690.

Cassagne, C., Ranque, S., Normand, A.C., Fourquet, P., Thiebault, S., Planard, C., Hendrickx, M., Piarroux, R. (2011). Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 6(12): e28425.

Chalupová, J., Raus, M., Sedlářová, M., Šebela, M. (2014). Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnol Adv* 32(1): 230-241.

Ciaro, D.E., Schär, G., Altwegg, M., Böttger, E.C., Bosshard, P.P. (2007). Identification of moulds in the diagnostic laboratory-an algorithm implementing molecular and phenotypic methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 59(1): 49-60.

Criseo, G., Scordino, F., Romeo, O. (2015). Current methods for identifying clinically

- important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Methods* 111: 50-56.
- Çavuş, S., Tornuk, F., Sarioglu, K., Yetim, H. (2018). Determination of mold contamination and aflatoxin levels of the meat products/ingredients collected from Turkey market. *J Food Safety* 38(5): e12494, doi: 10.1111/jfs.12494.
- Decontardi, S., Soares, C., Lima, N., Battilani, P. (2018). Polyphasic identification of *Penicillia* and *Aspergilli* isolated from Italian grana cheese. *Food Microbiol* 73:137-149. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.012>
- Drissner, D., Freimoser, F.M. (2017). MALDI-TOF mass spectroscopy of yeasts and filamentous fungi for research and diagnostics in the agricultural value chain. *Chem Biol Technol Agric* 4(1): 13, doi: 10.1186/s40538-017-0095-7.
- Dulla, E.L., Kathera, C., Gurijala, H.K., Mallakuntla, T.R., Srinivasan, P., Prasad, V., Mopati R.D., Jasti, P.K. (2016). Highlights of DNA Barcoding in identification of salient microorganisms like fungi. *J Mycol Med* 26(4): 291-297.
- El-Fadaly, H.M., El-Kadi, S.M., Hamad, M.N., Habib, A.A. (2015). Isolation and identification of Egyptian Ras Cheese (Romy) contaminating fungi during ripening period. *J Microbiol Res* 5(1): 1-10.
- Erukhimovitch, V., Tsror, L., Hazanovsky, M., Talyshinsky, M., Mukmanov, I., Souprun, Y., Huleihel, M. (2005). Identification of fungal phyto-pathogens by Fourier-Transform Infrared (FTIR) microscopy. *J Agric Technol* 1(1): 145-152.
- Fatimoh, A.O., Moses, A.A., Adekunle, O.B., Dare, O.E. (2017). Isolation and identification of rot fungi on post-harvest of pepper (*Capsicum annum* L.) fruits. *AASCIT J Biol* 3(5): 24-29.
- Fapohunda, S.O., Moore, G.G., Aroyeun, S.O., Ayeni, K.I., Aduroja, D.E., Odetunde, S.K. (2018). Isolation and characterization of fungi isolated from Nigerian cocoa samples. *Current Life Sciences* 4(3): 46-52.
- Fischer, G., Braun, S., Thissen, R., Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *J Microbiol Methods* 64(1): 63-77.
- Flórez, A.B., Álvarez-Martín, P., López-Díaz, T.M., Mayo, B. (2007). Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. *Int Dairy J* 17(4): 350-357.
- Francesca, N., Gaglio, R., Stucchi, C., De Martino, S., Moschetti, G., Settanni, L. (2018). Yeasts and moulds contaminants of food ice cubes and their survival in different drinks. *J Appl Microbiol* 124(1): 188-196.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., et al. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*, *Nature*, 422: 859-868.
- Garcia, M.V., Parussolo, G., Moro, C.B., Bernardi, A.O., Copetti, M.V. (2018). Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. *Food Microbiol* 73: 93-98.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int J Food Microbiol* 241: 191-197.
- Gautier, M., Ranque, S., Normand, A.C., Becker, P., Packeu, A., Cassagne, C., L'Ollivier, C., Hendrickx, M., Piarroux, R. (2014). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect* 20(12): 1366-1371.
- Hawksworth, D.L. (2015). Naming fungi involved in spoilage of food, drink, and water. *Curr Opin Food Sci* 5: 23-28.
- Hayaloğlu, A.A., Kırbağ, S. (2007). Microbial quality and presence of moulds in Kufllu cheese. *Int J Food Microbiol* 115(3): 376-380.
- Hendrickx, M. (2017). MALDI-TOF MS and filamentous fungal identification: A Success Story. *Curr Fungal Infect Rep* 11(2): 60-65.

- Heperkan, D. (2014). Mikotoksinlerin Önemi. *Gıdalarda Mikotoksinler*, Heperkan, D. (ed.), Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir, Türkiye, s. 1-22.
- Hertwig, A.M., Sant'Ana, A.S., Sartori, D., da Silva, J.J., Nascimento, M.S., Iamanaka, B.T., Fungaro, M.H.P., Taniwaki, M.H. (2018). Real-time PCR-based method for rapid detection of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* isolated from coffee. *J Microbiol Methods* 148: 87-92, doi: 10.1016/j.mimet.2018.03.010.
- Houbraken, J., Samson, R.A. (2017). Current taxonomy and identification of foodborne fungi. *Curr Opin Food Sci* 17: 84-88.
- Jedidi, I., Soldevilla, C., Lahouar, A., Marín, P., González-Jaén, M.T., Said, S. (2018). Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi J Biol Sci* 25(5): 868-874.
- Jiang, J., Qiao, X., He, R. (2016). Use of Near-Infrared hyperspectral images to identify moldy peanuts. *J Food Eng* 169: 284-290.
- Jogee, P.S., Ingle, A.P., Rai, M. (2017). Isolation and identification of toxigenic fungi from infected peanuts and efficacy of silver nanoparticles against them. *Food Control* 71: 143-151.
- Kandpal, L.M., Cho, B. (2014). A Review of the Applications of Spectroscopy for the Detection of Microbial Contaminations and Defects in Agro Foods. *J Biosyst Eng* 39(3):215-226.
- Kim, Y., Nandakumar, M.P., Marten, M.R. (2007). Proteomics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol* 25(9): 395-400.
- Koffi, Y.F., Diguta, C., Alloue-Boraud, M., Koffi, L.B., Dje, M., Gherghina, E, Matei, F. (2019). PCR-ITS-RFLP identification of pineapple spoilage fungi. *Rom Biotechnol Lett* 24:418-424.
- Kure, C.F., Skaar, I., Brendehaug, J. (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. *Int J Food Microbiol* 93(1): 41-49.
- Lecellier, A., Gaydou, V., Mounier, J., Hermet, A., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait, M., Toubas, D., Sockalingum, G.D. (2015). Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol* 45: 126-134.
- Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait M., Toubas, D., Sockalingum, G.D. (2014). Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int J Food Microbiol* 168: 32-41.
- Lima, N., Santos, C. (2017). MALDI-TOF MS for identification of food spoilage filamentous fungi. *Curr Opin Food Sci* 13: 26-30.
- Lozano-Ojalvo, D., Rodríguez, A., Cordero, M., Bernáldez, V., Reyes-Prieto, M., Córdoba, J.J. (2015). Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages. *Meat Sci* 100: 283-290.
- Luethy, P.M., Zelazny, A.M. (2018). Rapid one-step extraction method for the identification of molds using MALDI-TOF MS. *Diagn Microbiol Infect Dis* 91(2): 130-135.
- Lüthje, P., Pranada, A.B., Carruthers-Lay, D., Desjardins, M., Gaillot, O., Wareham, D., Ciesielczuk, H., Özenci, V. (2017). Identification of microorganisms grown on chromogenic media by MALDI-TOF MS. *J Microbiol Methods* 136: 17-20.
- Mailafia, S., Okoh, G.R., Olabode, H.O.K., Osanupin, R. (2017). Isolation and identification of fungi associated with spoiled fruits vended in Gwagwalada market, Abuja, Nigeria. *Vet World* 10(4): 393-397, doi: 10.14202/vetworld.2017.393-397
- Miguel, M.G.D.C.P., de Castro Reis, L.V., Efraim, P., Santos, C., Lima, N., Schwan, R.F. (2017). Cocoa fermentation: Microbial identification by MALDI-TOF MS and sensory evaluation of produced chocolate. *LWT-Food Sci Technol* 77: 362-369, doi: 10.1016/j.lwt.2016.11.076.
- Moubasher, A.A., Abdel-Sater, M.A., Soliman, Z.S.M. (2018). Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. *J Mycol Med* 28(1): 76-86.
- Oberle, J., Dighton, J., Arbuckle-Keil, G. (2015). Comparison of methodologies for separation of fungal isolates using Fourier Transform Infrared

- (FTIR) spectroscopy and Fourier Transform Infrared-Attenuated total reflectance (FTIR-ATR) microspectroscopy. *Fungal Biol* 119(11): 1100-1114.
- Oliveira, M.M.E., Santos, C., Sampaio, P., Romeo, O., Almeida-Paes, R., Pais, C., Lima, N., Zancopé-Oliveira, R.M. (2015). Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Res Microbiol* 166(2): 102-110.
- Panda, A., Ghosh, A.K., Mirdha, B.R., Xess, I., Paul, S., Samantaray, J.C., Srinivasan A., Khalil, S., Rastogi, N., Dabas, Y. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of clinical fungal isolates based on ribosomal protein biomarkers. *J Microbiol Methods* 109: 93-105.
- Panelli, S., Buffoni, J. N., Bonacina, C., Feligini, M. (2012). Identification of moulds from the Taleggio cheese environment by the use of DNA barcodes. *Food Control* 28(2): 385–391.
- Pinheiro, A. C., Macedo, M. F., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C., Viegas, C., Brandão, J., Rosado, L. (2011). Mould and yeast identification in archival settings: Preliminary results on the use of traditional methods and molecular biology options in Portuguese archives. *Int Biodeter Biodegr* 65(4): 619-627.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd Edition, Springer, New York, 519p, ISBN: 978-0-387-92206-5.
- Quéro, L., Girard, V., Pawtowski, A., Tréguer, S., Weill, A., Arend, S., Cellière, B., Polsinelli, S., Monnin, V., Belkum, A.V., Nodet, P., Mounier, J., Vasseur, V. (2018). Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiol* 1-13, doi: 10.1016/j.fm.2018.05.001.
- Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod* 80(3): 756-770.
- Ranque, S., Normand, A.C., Cassagne, C., Murat, J.B., Bourgeois, N., Dalle, F., Gari-Toussaint, M., Fourquet, P., Hendrickx, M., Piarroux, R. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry identification of filamentous fungi in the clinical laboratory. *Mycoses* 57(3): 135-140.
- Rico-Munoz, E., Samson, R.A., Houbraeken, J. (2018). Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiol* 1-12, doi: 10.1016/j.fm.2018.03.016.
- Ruiz-Moyano, S., Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Hernández, A., Córdoba, M.G. (2009). Characterization of molds isolated from smoked paprika by PCR-RFLP and micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Food Microbiol* 26:776–782.
- Sacristán, N., Mayo, B., Fernández, E., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E., Castro, J.M. (2013). Molecular study of *Geotrichum* strains isolated from Armada cheese. *Food Microbiol* 36(2): 481-487.
- Samson, R. A. (2010). *Food and indoor fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, ISBN: 9789070351823.
- Sanguinetti, M., Posteraro, B. (2017). Identification of molds by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 55(2): 369-379.
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Res Microbiol* 161(2): 168-175.
- Shapaval, V., Moretro, T., Suso, H.P., Åsli, A.W., Schmitt, J., Lillehaug, D., Martens, H., Böcker, U., Kohler, A. (2010). A high-throughput microcultivation protocol for FTIR spectroscopic characterization and identification of fungi. *J Biophotonics* 3(8-9): 512-521.
- Shapaval, V., Møretro, T., Wold Åsli, A., Suso, H.P., Schmitt, J., Lillehaug, D., Kohler, A. (2017). A novel library-independent approach based on high-throughput cultivation in Bioscreen and fingerprinting by FTIR spectroscopy for microbial source tracking in food industry. *Lett Appl Microbiol* 64(5): 335-342.
- Shehu, K., Tafinta, I.Y. (2017). Identification of fungi associated with fruit rot of coconut

- (*Cocos nucifera* L.) in Sokoto State, North-Western Nigeria. *J Zool Biosci Res* 1(1): 20-23.
- Sivaraman, G.K., Visnuvinayagam, S., Jha, A.K., Remya, S., Renuka, V., Ajeesh, K., Vanik, D. (2018). Molecular divergence and identification of *Aspergillus* species in dry fishes of Gujarat India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 88(2): 505-515.
- Srivastava, S., Gupta, P.S., Lal, S., Sinha, O.K. (2017). Rapid identification of endophytic fungi of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid) using PCR-RFLP of rDNA. *J Environ Biol* 38(1):21-26.
- Stübiger, G., Wuczkowski, M., Mancera, L., Lopandic, K., Sterflinger, K., Belgacem, O. (2016). Characterization of yeasts and filamentous fungi using MALDI lipid phenotyping. *J Microbiol Methods* 130: 27-37.
- Surženko, M., Kontram, K., Sarand, I. (2017). PCR-based fingerprinting and identification of contaminative fungi isolated from rye breads. *Agron Res* 15(1): 288-297.
- Trabelsi, H., Neji, S., Hadrich, I., Khemakhem, N., Sellami, H., Makni, F., Ayadi, A. (2019). Contribution of the internal transcribed spacer regions to the detection and identification of human fungal pathogens. *Curr Res Transl Med* 67(3):100-106.
- Ushasri, K., Kumar, B.A. (2018). Isolation and identification of fungal pathogen from (*Allium Cepa* L.) In Piler vegetable market, Andhrapradesh, India. *WJPPS* 7(3): 955-963.
- Vij, D.R., (2007). *Handbook of applied solid state spectroscopy*. Springer Science and Business Media, New York, 742p, ISBN: 0-387-32497-6.
- Villalobos, M.C., Serradilla, M.J., Martín, A., Hernández-León, A., Ruíz-Moyano, S., Córdoba, M.G. (2017). Characterization of microbial population of breba and main crops (*Ficus carica*) during cold storage: Influence of passive modified atmospheres (MAP) and antimicrobial extract application. *Food Microbiol* 63:35–46. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.035>
- Wakai, S., Arazoe, T., Ogino, C., Kondo, A. (2017). Future insights in fungal metabolic engineering. *Bioresour Technol* 245: 1314-1326.
- Wattal, C., Oberoi, J.K., Goel, N., Raveendran, R., Khanna, S. (2017). Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of microorganisms in the routine clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36(5): 807-812.
- Zhao, J., Liu, W., Liu, D., Lu, C., Zhang, D., Wu, H., Dong, D., Meng, L. (2018). Identification and evaluation of *Aspergillus tubingensis* as a potential biocontrol agent against grey mould on tomato. *J Gen Plant Pathol* 84: 148-159.



ERİK (*Prunus domestica*) BAZLI KARIŞIK MEYVELİ GELENEKSEL MARMELAT ÜRETİMİ

**Filiz Uçan Türkmen*, Büşra Nur Bingöl, Elif Şahin,
Funda Özkaraman, Zeynep Tekin**

Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kilis, Türkiye

Geliş/ *Received*: 01.04.2019; Kabul/ *Accepted*: 07.07.2019; Online baskı / *Published online*: 25.07.2019

Uçan Türkmen, F., Bingöl, B.N., Şahin, E., Özkaraman, F., Tekin, Z. Erik (*Prunus domestica*) bazlı karışık meyveli geleneksel marmelat üretimi. *GIDA* (2019) 44 (4): 707-718 doi: 10.15237/gida.GD19065

Uçan Türkmen, F., Bingöl, B.N., Şahin, E., Özkaraman, F., Tekin, Z. Production of traditional marmalade with mixed fruit based plum (*Prunus domestica*). *GIDA* (2019) 49 (4): 707-718 doi: 10.15237/gida.GD19065

ÖZ

Bu çalışmada erik bazlı karışık meyveli geleneksel marmelat üretimi üzerine çalışılmıştır. %100 Erik, %75 erik-%25 kayısı, %75 erik-%25 yabanmersini, %50 erik-%25 kayısı- %25 yabanmersini oranlarında meyveler kullanılarak marmelat üretimleri gerçekleştirilmiştir. Üretilen marmelat örneklerinde ve meyve pulplarında pH, suda çözünür kuru madde, titrasyon asitliği, su aktivitesi, kül, renk, invert şeker, toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde, antioksidan aktivite, askorbik asit ve duyu analizler yapılmış ve örnekler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. En yüksek toplam fenolik madde (2.12 mg GAE/g-3.91 2.12 mg GAE/g) ve antioksidan aktivite (%79.49-%73.04) değerleri %75 erik-%25 kayısı pulp ve marmelatlarından elde edilmiştir. Duyusal değerlendirmede en çok beğenilen marmelatın 4.46 puan ile erik pulpundan üretilen örnek olduğu ve bunu azalan puan sırasına göre erik-kayısı-yabanmersini, erik-kayısı, erik-yabanmersini pulplarından üretilen örneklerin takip ettiği belirlenmiştir. Bu çalışma yeni formüle edilmiş ürün gelişimine gerek duyan erik endüstrisine farklı meyvelerle karıştırılmış erik bazlı marmelat ile eriğe yeni bir kullanım alanı sağlanabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Erik, kayısı, yaban mersini, marmelat, antioksidan aktivite

PRODUCTION OF TRADITIONAL MARMALADE WITH MIXED FRUIT BASED PLUM (*Prunus Domestica*)

ABSTRACT

In this research, the production of traditional marmalade with mixed fruit based plum is studied. The production of marmalade was performed using 100% Plum, 75% plum-25% apricot, 75% plum-25% blueberry, 50% plum-25% apricot-25% blueberry. In the produced marmalade samples and fruit pulps, pH, water soluble dry matter, titratable acidity, water activity, ash, color, invert sugar, total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity, ascorbic acid and sensory analyzes were made and samples were evaluated statistically. The highest total phenolics (2.12 mg GAE/g-3.91 mg GAE/g) and antioxidant activity (79.49%-73.04%) were obtained from 75% plum-25% apricot pulp and marmalade. It was determined that the most popular marmalade in sensory evaluation was the sample produced from plum pulp with a score of 4.46, followed by plum-apricot-blueberry, plum-apricot and plum cranberry pulp. This study shows that a new usage area can be provided with plum-based marmalade mixed with different fruits to the plum industry which needs new formulated product development.

Keywords: plum, apricot, blueberry, marmelade, antioxidant activity.

*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ucanfiliz@gmail.com,

☎ (+90) 348 814 3096/1812

☎ (+90) 348 814 3098

GİRİŞ

Erik '*Prunus domestica*', yeşil, sarı, kırmızı ya da mor renkli, ekşi ya da tatlı çeşit çeşit meyve veren erik ağaçları gülgiller familyasının *Prunus* cinsindedir. Kafkasya ve Hazar Deniz'i çevresinden dünyaya yayıldığı sanılmaktadır (Anonym., 2005a). Bugün Türkiye'de yetişen erik çeşitlerinin bir kısmı yerli, bir kısmı da yabancı çeşitlerdir (Anonym., 2005b). Erikler *Prunus cerasifera* (Yeşil erikler, Can erikler), *P. salicina* (Japon erikleri) ve *P. domestica* (Avrupa erikleri) olmak üzere üç türe ayrılmaktadır. Bu türler içinde Can erikleri sofralık ve anaçlık olarak, Japon erikleri sofralık ve teknolojik (reçel, meyve suyu, marmelat vb) olarak, Avrupa erikleri ise kurutmalık ve sofralık olarak tüketilmeye uygundur (Anonym., 2005c). Ülkemizde üç farklı doğal mavi yemiş türü (*Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium arctostaphylos* L., *Vaccinium uliginosum* L.) bulunmaktadır. Özellikle kısıtlı tarım alanına sahip Karadeniz bölgesinin dağlık alanlarda yaşayan köylüler doğrudan doğadan meyve toplayıp ya da sahip oldukları küçük üretim alanlarını bu amaçla kullanıp sosyal ormancılığa da önemli bir katkıda bulunmaktadır (Gültekin, 2010). Ülkemizde 2000'li yılların başlarında özellikle Doğu Karadeniz Bölgesinde boylu maviyemiş olarak adlandırılan boylu maviyemiş türünün birçok çeşidi (Brigitta, Bluecrop, Bluejay, Duke, Nelson, Earliblue, Patriot ve Spartan) ile adaptasyon denemeleri yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Çelik, 2006). Kayısının (*Prunus armeniaca* L.) anavatanının Çin'e kadar uzandığı ve Anadolu topraklarına girişinin iki bin yıldan fazla bir geçmişi olduğu bilinmektedir. Ülkemizde kayısı yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmakla birlikte ekonomik olarak yetiştiriciliği bazı bölgelerimize kaymıştır. Malatya bölgesi, Elazığ-Erzincan-Sivas bölgesi, Akdeniz bölgesi, Kars-Iğdır bölgesi, Ege bölgesi, İç Anadolu bölgesi ve Marmara bölgesi farklı yoğunluk ve çeşit deseninde üretim yapmakta olup, tüm üretimin yarısından fazlasını Malatya bölgesi karşılamaktadır (Muradoğlu ve ark., 2011).

Geleneksel marmelat; meyve pulpu, püre, meyve suyu ve sulu ekstraktlarının veya bitkilerin kök, yaprak, çiçek gibi yenilebilen kısımlarının gerektiğinde şekerler ve su ilave edilerek sürülme kıvamına getirilmiş karışımdır (Anonymous,

2006). Türk Gıda Kodeksi'ne göre marmelat; su, şeker, meyve veya turuncgillerin bir veya birkaç çeşidinden elde edilen pulpun Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde izin verilen katkı maddelerinin kullanılmasıyla uygun jel kıvamına getirilmiş karışımdır. Bu çalışmanın amacı, özellikle son yıllarda üretimi artış gösteren erik meyvesinin tüketiminin yaygınlaştırılması hedeflenerek yalın halde veya farklı meyveler ilavesiyle karışık meyveli geleneksel marmelat üretmek elde edilen bu marmelatların bazı kalite özelliklerini incelemektir. Bu amaçla hedefimiz, besleyici değeri ve katma değeri yüksek marmelatın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri ile duyu ve istatistiksel analizlerle elde edilen verilerden literatüre yeni bir ürün kazandırmaya çalışmak olmuştur.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Bu çalışmada, ana materyal olarak Kilis ilindeki semt pazarından temin edilen *Prunus domestica* cinsi erikler; *Vaccinium sp.* çeşidi yabanimersini ve *Prunus armeniaca* L. çeşidi kayısılar kullanılmıştır. Meyveler temin işleminden hemen sonra zarar görmeyecek şekilde Kilis 7 Aralık Üniversitesi Gıda Mühendisliği laboratuvarına getirilmiştir. Laboratuvarımıza getirilen tüm meyveler marmelat üretimleri gerçekleştirilinceye kadar $+4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir. Çalışmada marketten temin edilen ticari firmalara ait toz şeker (saf kristal sakkaroz), su, sitrik asit ve ayrıca ürünlerin ambalajlanmasında ise 200 mL'lik contalı twist-off kapaklı cam kavanozlar kullanılmıştır.

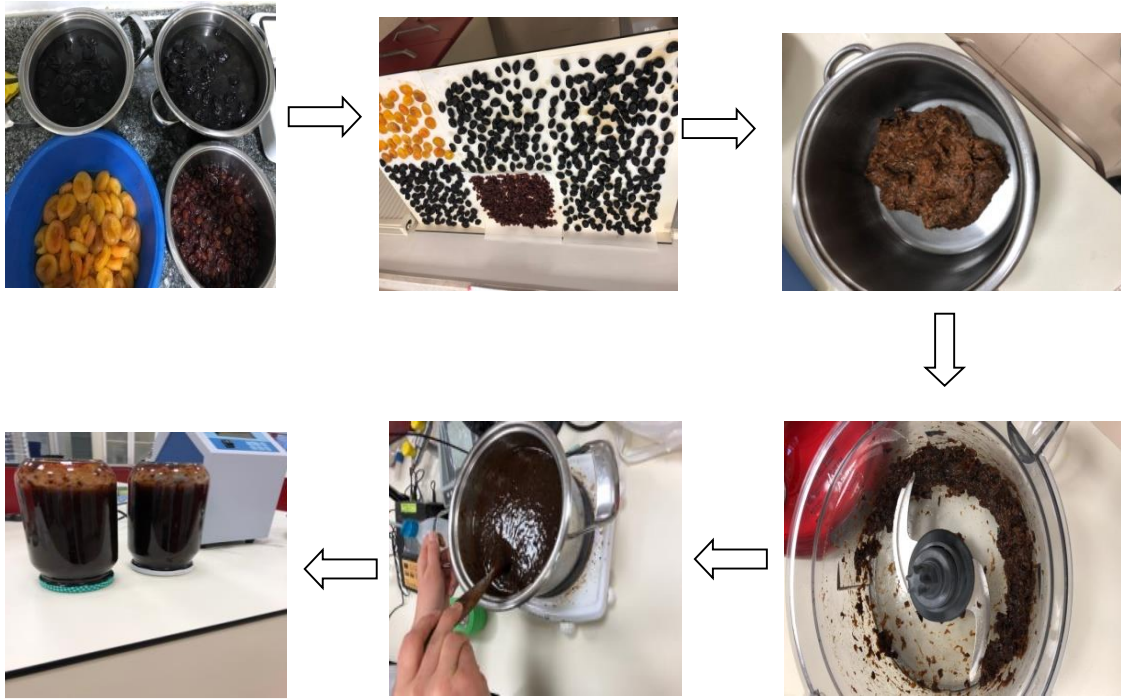
Yöntem

Marmelat Üretimi

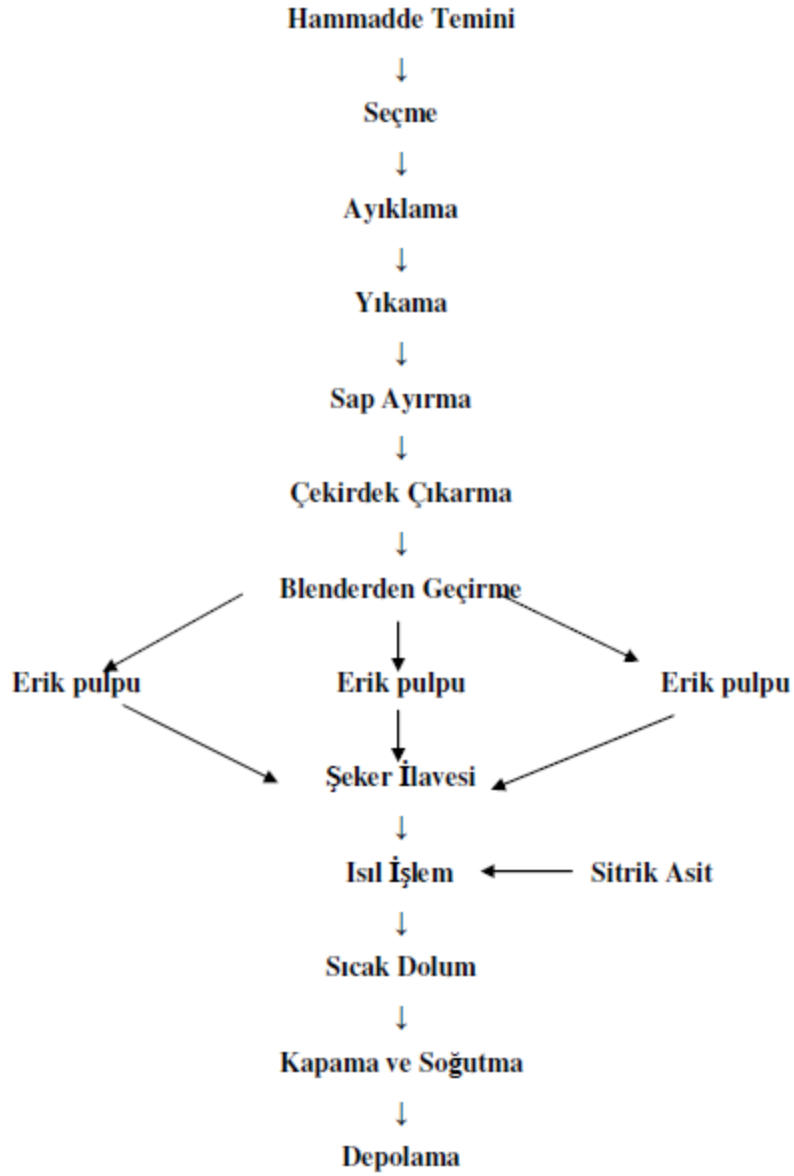
Laboratuvara getirilen meyveler seçme, ayıklama, yıkama, sap ayırma ve çekirdek çıkarma ile tartım işlemlerinden sonra kabuklarıyla birlikte blenderden (Arzum, AR1041, Türkiye) geçirilerek homojen hale getirilmiştir. Marmelatların üretimi sırasında blender, elektrikli ısıtıcı, açık kazanı temsilen tencere ve tahta spatuladan yararlanılmıştır. Bu çalışmada, Türk Gıda Kodeksi; "Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği"nde belirtilen geleneksel marmelat üretimi hedeflenerek aşağıda belirtilen

reçete uygulanmıştır. Marmelat Reçetesi: 1000 g meyve pulpu, 1000 g şeker, %25'lik sitrik asit çözeltisi (ürünün pH değeri 2.8-3.5 arasında olacak şekilde kontrollü olarak ilave edilmiştir) ve 300 ml su'dur. Marmelat üretimi; a) %100 Erik, b) %75 Erik ve %25 Kayısı, c) %75 Erik ve %25 Yabanmersini, d) %50 Erik, %25 Kayısı ve %25 Yabanmersini olmak üzere 4 farklı formülasyon uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Her bir marmelat formülasyonunda belirtilen oranlara uygun miktarda hazırlanan pulp ya da pulp karışımlarına reçetede belirtilen miktarlarda şeker ve su ilave edilerek örneklere açık kazanda pişirme (atmosferik basınçta) tekniği uygulanmıştır. Refraktometre ile kuru madde oranı aralıklarla ölçülerek pişirme süresi yaklaşık 30 dakika olacak şekilde tüm örneklere standart olarak uygulanmaya çalışılmıştır. Pişirme işleminin sonlarına doğru pH'ı 2.8-3.5 olacak şekilde

ayarlamak ve sakkarozun kısmen inversiyonunu sağlamak amacıyla pişmekte olan ürün içerisine %25 konsantrasyonda hazırlanan sitrik asit çözeltisi kontrollü olarak ilave edilmiş ve birkaç dakikalık pişirme işleminden sonra istenilen suda çözünen kuru maddeye (≥ 55 Briks) ulaşıldığında pişirme işlemine son verilmiştir (Şekil 1). Pişirme işlemi sonrasında ürünler 200 ml'lik metal kapaklı cam kavanozlara sıcak olarak doldurulmuş ve kavanozların ağızları metal twist-off kapakları ile hermetikli olarak kapatılıp kavanozlar ters çevrilmiş ve 10 dakika kadar bu şekilde bekletildikten sonra kavanozlar normal pozisyonuna çevrilmiştir. Kavanozlar kademeli olarak yaklaşık 30 °C' ye kadar soğutulmuş ve analiz yapılıncaya kadar oda sıcaklığında karanlık bir yerde muhafaza edilmiştir. Çalışmada her uygulama 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir (Kaya ve ark., 2016) (Şekil 2).



Şekil 1. Yalın ve Karışık Meyveli Erik Marmelatı Üretimi



Şekil 2. Yalın ve Karışık Meyveli Erik Marmelatı Üretimi Akış Şeması

Uygulanan Analizler

Pomolojik analizler

Tesadüfi olarak alınan 10 adet eriğin en ve boy ölçümleri, Inox marka kumpas yardımı ile yapılmış ve ortalama değerler “mm” olarak belirtilmiştir. Tesadüfi olarak alınan 10 adet eriğin ağırlık ölçümleri, 0.01 grama duyarlı elektronik terazi (ATX224, Shimadzu, Japan) ile yapılmış ve ortalama sonuçlar gram olarak belirtilmiştir. Tesadüfi olarak alınan 10 adet eriğin çıkartılan

çekirdekleri tartılmış ve ortalama sonuçlar gram olarak verilmiştir.

Fizikokimyasal analizler

pH değerleri cam elektrotlu ISOLAB marka pH metre kullanılarak ölçülmüştür (Cemeroğlu, 2007). Titrasyon asitliği tayini Sanchez-Moreno (2003) tarafından verilen yöntemle yapılmış ve sonuçlar, sitrik asit cinsinden g/100g olacak şekilde hesaplanmıştır. Suda çözünür kuru madde

miktarı masa tipi el refraktometresi (Milwaukee MA871 Refractometer) ile $+20^{\circ}\text{C}$ ' de belirlenmiştir. Sonuçlar % olarak ifade edilmiştir (Cemeroğlu, 2007). Su aktivitesi ölçümü ölçüm cihazı (Novasina-Labtouch-aW) kullanılarak yapılmıştır. Kül miktarı tayininde, AACC (1999) tarafından bildirilen metot kullanılmıştır. Örneklerin viskozitesi Fungilab Expert (Model L, Sant Feliu de Llobregat, Barcelona) marka vizkozimetre kullanılarak 100 rpm'de L4 spindle ile belirlenip cP olarak ifade edilmiştir.

Diğer analizler

Örneklerdeki toplam fenolik ve toplam flavanoid içerikleri ile antioksidan ve askorbik asit tayinleri Uçan Türkmen ve Mercimek Takcı (2018) tarafından verilen yöntemlere göre yapılmıştır. 5-hidroksimetilfurfural (HMF) içeriği, kırmızı renkli bir kompleks oluşturan, barbitürik asit, p-toluidin ve HMF arasındaki kolorimetrik reaksiyona dayalı olarak Cemeroğlu (2007) tarafından tarif edilen prosedür izlenerek tespit edilmiştir. İvert şeker Mercimek Takcı ve Uçan Türkmen (2016) tarafından verilen yöntemle tayin edilmiştir. Renk (CIE L*, a*, b*) analizi, el tipi renk cihazı (HunterLab miniscan EZ, ABD) ile belirlenmiştir.

Buna ek olarak, Hue ve kroma değerleri aşağıdaki formüller baz alınarak kullanılmıştır:

$$Hue^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

13 kişilik panelist grubu tarafından yapılan duyuşal değerlendirmede marmelatlar “renk”, “tat ve lezzet”, “kıvam”, “koku” ve “genel izlenim” özellikleri bakımından değerlendirilmiştir (Watts ve ark., 1989; Altuğ, 1993). Örnekler arasındaki önemli farklılıkları saptamak amacıyla Windows SPSS 23.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ve Duncan çoklu karşılaştırma testi aracılığıyla istatistiksel analizler yapılmıştır. Her bir analiz üç tekerrürlü yapılmıştır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Erik (%100), Erik (%75)-Kayısı (%25), Erik (%75)-Yabanmersini (%25), Erik (%50)-Kayısı (%25)-Yabanmersini (%25) Pulplarının Özellikleri

Çizelge 1’de görüldüğü gibi marmelata işlenecek eriklerin ortalama en, boy, ağırlık ve çekirdek ağırlığı değerleri sırası ile 5.25mm, 4.60mm, 106.8g ve 15.3g olarak bulunmuştur.

Çizelge 1. Eriğin Pomolojik Özellikleri
Table 1. Pomological Characteristics of Plum

	Eni <i>Width</i>	Boyu <i>Length</i>	Ağırlığı <i>Weight</i>	Çekirdek Ağırlığı <i>Weight of Core</i>
Erik <i>Plum</i>	5.25mm	4.60mm	106.8g	15.3g

Çizelge 2’de görüldüğü gibi meyve pulp karışımlarının pH, SÇKM, titrasyon asitliği ve su aktivitesi değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Erik pulpunun pH değerleri 4.32 iken; diğer meyve pulpları ile hazırlanan örneklerin pH değerleri 3.99-4.41 arasında değişiklik göstermiştir. pH derecesi 3.5 derecenin altına düştükçe jelin kıvamı artmakta, jelde de bir katılaşma görülmektedir. pH’nın jel kıvamına etkisi, pektin ağını oluşturan liflerin belli pH sınırlarında esneklik kazanması şeklinde açıklanmaktadır. Buna göre pH belirli sınırlar arasındayken pektin lifleri maksimum esneklik kazanmakta ve iyi bir jel oluşturmaktadır

(Cemeroğlu ve ark., 2003). SÇKM değerleri yalnız erik pulpunda %38.8 iken diğerlerinde %33.6-38.3 arasında bulunmuştur (Çizelge 2). Titrasyon asitliği değerleri yalnız erik pulpunda 8.87 g/100mL iken karışımlarda 7.54-9.00 g/100mL arasında değişmiştir (Çizelge 2). Pulp örneklerinin viskozite değerleri 4827.50-4851.50 cP aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 2) ($P>0.05$). Su aktivitesi (a_w) yalnız erik pulpunda 0.928 iken diğerlerinde 0.938-0.944 arasında bulunmuştur (Çizelge 2). Atıcı (2013), çalışmasında taze erik örneklerinin ortalama su aktivitesi değerlerini 0.919, katkılı pulp ve katkısız pulp örneklerinin ortalama su aktivite değerlerini ise sırasıyla 0.907 ve 0.953

olarak belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacı, katkılı pulp örneklerinin, kontrol pulp örneklerine ve hammaddeye göre su aktivitesi değerlerinin daha düşük bulunmasının sebebinin şekerin yapısında bulunan serbest suyu bağlamasından kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Erik pulpunun kül değeri %0.91 iken, diğer meyve pulpları ile hazırlanan örneklerin kül değerleri %0.74-1.105

arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 2). Meyve pulp karışımlarının kül içerikleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Genel anlamda suda çözünür kuru madde değeri yüksek olan pulpların kül değerleri yüksek bulunurken, düşük değere sahip olan pulpların kül değerleri de düşük bulunmuştur.

Çizelge 2. Marmelat Üretiminde Kullanılan Pulpun Fizikokimyasal Özellikleri
Table 2. Physicochemical properties of pulps used in production of marmalade

Örnekler Samples	pH pH	Suda Çözünür Kuru Madde (°Briks) Total soluble solids (TSS) (°Brix)	Titrasyon Asitliği (g/100 mL) Titratable acidity (g/100 mL)	Su Aktivitesi (a_w) Water activity (a_w)	Kül (%) Ash (%)	Viskozite (cP) Viscosity (cP)
Erik (%100) Plum (%100)	4.32±0.00 ^b	38.8±0.35 ^a	8.87±0.39 ^a	0.928±0.928 ^c	0.91±0.05 ^{ab}	4827.00±5.0 ^a
Erik(%75)- Kayısı(%25) Plum(%100) Apricot (%25)	4.41±0.01 ^a	36.7±0.30 ^b	9.00±0.03 ^a	0.940±0.941 ^a	0.86±0.20 ^{ab}	4839.00±0.00 ^a
Erik(%75)- Yabanmersini(%25) Plum(%75)- Blueberry(%25)	3.99±0.01 ^d	33.6±0.36 ^c	7.54±0.03 ^b	0.944±0.944 ^a	0.74±0.00 ^b	4851.50±16.5 ^a
Erik (%50)- Kayısı (%25)- Yabanmersini (%25) Plum(%50)- Apricot (%25) Blueberry(%25)	4.21±0.00 ^c	38.3±0.00 ^a	7.63±0.03 ^b	0.938±0.938 ^b	1.105±0.14 ^a	4849.50±9.5 ^a

*Sütunlarda farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.
Differences between the examples shown in columns with different lowercase letters are important at 0.05 level.

Meyve pulp karışımlarının L^* , a^* , b^* ve invert şeker değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$) (Çizelge 3). Renk ölçümü esnasında " L^* ", " a^* " ve " b^* " değerleri elde edilmiş olup, " L^* " değeri parlaklıktan koyuluğa, " $+ a^*$ " kırmızılığa, " $- a^*$ " yeşillığe, " $+ b^*$ " sarılığa ve " $- b^*$ " ise maviliğe gidişi göstermektedir (Gould, 1977). En düşük L^* değeri (0.42) yalın erik pulpunda, en yüksek L^* değeri (2.03) ise erik-kayısı pulp karışımında tespit edilmiştir. Erik pulpuna kayısı katıldığında, L^*

değerinde artış gözlenmiş, kayısı miktarı arttıkça L^* değeri artmıştır. Antosiyanin içeren meyve ve sebze ürünlerinin rengi, çeşitli etkenlerle antosiyaninlerin parçalanması sonucu değişmektedir. Bu hususta sıcaklık, askorbik asit, şekerler ve parçalanma ürünleri, hatta enzimler, oksijen, ışık gibi birçok faktör rol oynamaktadır (Cemeroğlu, 2004). Meyve pulplarının a^* (+kırmızı, yeşil) değerleri 2.82-10.81 arasında değişim göstermiştir (Çizelge 3). En yüksek a^* değeri erik-kayısı pulpunda tespit edilmiştir. Aynı

zamanda pulp karışımında kayısı-erik pulpu oranı azalır, yabanmersini veya erik pulpu oranı arttıkça, a^* değerinde de azalma görülmüştür. Bu sonuç üzerinde meyve et renklerine ilaveten, pulp işlemleri sırasında yabanmersini ve eriğin okside olarak renklerinin koyulaşmasının da etkisinin olduğu düşünülmektedir. Meyve pulp karışımlarında en yüksek b^* (+sarı,-mavi) değeri

erik-kayısı pulp karışımında 3.50 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 3). En yüksek Hue ve Kroma değerleri %25 kayısı katkılı marmelatın elde edilmiştir. İnvert şeker değeri yalın erik pulpunda 58.672 $\mu\text{mol/mL}$ iken diğer pulp karışımlarında 64.358-65.339 $\mu\text{mol/mL}$ arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Marmelat Üretiminde Kullanılan Pulpun Renk ve İnvert Şeker Değerleri
Table 3. Color and invert sugar values of pulps used in production of marmalade

Örnekler Samples	L^* L^*	a^* a^*	b^* b^*	Hue Hue	Kroma Chroma	İnvert Şeker ($\mu\text{mol/mL}$) Invert sugar ($\mu\text{mol/mL}$)
Erik (%100) Plum (%100)	0.42±0.002 ^d	2.82±0.12 ^d	0.72±0.04 ^d	14.44±0.10 ^c	2.91±0.12 ^d	58.672±1.740 ^b
Erik(%75)- Kayısı(%25) Plum(%100) Apricot (%25)	2.03±0.12 ^a	10.81±0.03 ^a	3.50±0.21 ^a	17.94±0.96 ^a	11.36±0.09 ^a	65.339±0.704 ^a
Erik(%75)- Yabanmersini(%25) Plum(%75)- Blueberry(%25)	1.12±0.00 ^c	7.06±0.03 ^c	1.94±0.02 ^c	15.32±0.04 ^{bc}	7.33±0.04 ^c	65.123±2.016 ^a
Erik (%50)- Kayısı (%25)- Yabanmersini (%25) Plum(%50)- Apricot (%25) Blueberry(%25)	1.60±0.23 ^b	9.60±1.24 ^b	2.76±0.39 ^b	16.05±0.15 ^b	10.00±1.30 ^b	64.358±1.783 ^a

*Sütunlarda farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.
Differences between the examples shown in columns with different lowercase letters are important at 0.05 level.

Toplam fenolik madde miktarı değeri yalın erik pulpunda 2.10 mg GAE/g iken diğer pulplarda 1.71-2.12 mg GAE/g arasında değişiklik göstermiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4). Kaya ve ark. (2016), çalışmasında kayısı pulpunun toplam fenolik madde miktarını ortalama 111.56 mg GAE/kg olarak belirlemişlerdir. Erik pulpunun toplam flavonoid madde miktarı değeri 0.010 mg RE/kg iken, diğer pulplarda 0.007-0.009 mg RE/kg arasında değişmiştir (Çizelge 4). Meyve pulp karışımlarının toplam flavonoid madde miktarı değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). Pulp örneklerinin antioksidan aktivite değerleri %58.98-79.49

arasında değişiklik göstermiştir ($P<0.05$). Antioksidan aktivite değeri en yüksek marmelatın erik-kayısı marmelatı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4). En düşük değerler erik-kayısı-yabanmersini karışımlarında görülmüştür. Atıcı (2013), çalışmasında erik örneklerinin ortalama antioksidan aktivite değerlerini %66.77, katkılı pulp örneklerinin %65.03, kontrol pulp örneklerinin ise %65.38 olarak belirlemiştir (Çizelge 4). Yalın erik pulpunun askorbik asit değeri 49.04 mg/L iken, diğer pulpların askorbik asit değerleri 49.55-50.90 mg/L arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4) ($P>0.05$).

Çizelge 4. Marmelat Üretiminde Kullanılan Pulpların Toplam Fenolik Madde, Toplam Flavonoid Madde, Antioksidan Aktivite ve Askorbik Asit Değerleri

Table 4. Total phenolic matter, total flavonoid matter, antioxidant activity and ascorbic acid values of pulps used in production of marmelade

Örnekler Samples	Toplam Fenolik (mg GAE/g) Total phenolics (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid (mg RE/kg) Total flavonoids (mg RE/kg)	Antioksidan Aktivite (%) Antioxidant activity (%)	Askorbik Asit (mg/L) Ascorbic acid (mg/L)
Erik (%100) Plum (%100)	2.10±0.10 ^a	0.010±0.00 ^a	72.14±1.66 ^b	49.04±0.96 ^b
Erik(%75)- Kayısı(%25) Plum(%100)- Apricot (%25)	2.12±0.02 ^a	0.009±0.00 ^{ab}	79.49±4.85 ^a	49.55±0.11 ^{ab}
Erik(%75)- Yabanmersini(%25) Plum(%75)- Blueberry(%25)	1.74±0.04 ^b	0.009±0.00 ^{ab}	64.53±2.22 ^c	50.90±1.31 ^a
Erik (%50)- Kayısı (%25)- Yabanmersini (%25) Plum(%50)- Apricot (%25) Blueberry(%25)	1.71±0.02 ^b	0.007±0.00 ^b	58.98±5.46 ^c	49.81±0.58 ^{ab}

*Sütunlarda farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.

Differences between the examples shown in columns with different lowercase letters are important at 0.05 level.

Erik (%100), Erik (%75)-Kayısı (%25), Erik (%75)-Yabanmersini (%25), Erik (%50)-Kayısı (%25)-Yabanmersini (%25) Marmelatlarının Özellikleri

Marmelat karışımlarının pH, SÇKM, titrasyon asitliği, su aktivitesi ve kül değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Tüm marmelat örneklerinin pH değerleri 3.60-3.87 arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 5). Reçel, Jöle, Marmelat Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği'nde gerekli pH derecesinin 2.8-3.5 olması belirtilmiştir. SÇKM değeri yalnız erik marmelatında %63.6, kayısı katkılı marmelatla %62.8, yabanmersini katkılı marmelatla %62.8 iken kayısı-yabanmersini katkılı marmelatla %63.1'dir (Çizelge 5). Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği'nde geleneksel marmelatla refraktometre ile tayin edilen çözünür kuru madde içeriğinin %55'den daha az olmaması gerektiği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre marmelat örneklerinin suda

çözünür kuru madde oranlarının tebliğe uygun olduğu görülmüştür. Marmelat örneklerinde titrasyon asitliği miktarları 11.60-17.41 g/100mL arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 5). Su aktivitesi (a_w) yalnız erik marmelatında 0.854 iken, diğerlerinde 0.858-0.862 arasında bulunmuştur (Çizelge 5) ($P < 0.05$). Marmelat örneklerinin viskozite değerleri 3874.50-4832.00 cP aralığında tespit edilmiştir (Çizelge 5). En düşük kül içeriğinin (%0.15) yabanmersini katkılı marmelatla, en yüksek kül içeriğinin ise (%1.55) yalnız erik marmelat örneklerinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5) ($P < 0.05$). Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği'ne göre kül miktarının geleneksel marmelatla en çok 20mg/kg olabileceği belirtilmiştir.

Marmelat karışımlarının L^* , a^* , b^* ve invert şeker değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$) (Çizelge 6). Marmelat

üretiminde L* değeri en düşük (1.02) kayısı katkılı marmelatta tespit edilirken, en yüksek (2.22) L* değeri kayısı-yabanmersini katkılı marmelatta tespit edilmiştir. a* değerleri 1.16-2.02 arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek b* değeri (2.28) erik-kayısı-yabanmersini marmelat karışımında tespit edilirken, en düşük b* değeri (1.56) ise erik-kayısı marmelat karışımlarında gözlemlenmiştir. En yüksek Hue değerleri yalnız erik pulpu marmelatında, en yüksek kroma değerleri ise erik kayısı yaban mersini marmelat örneklerinden elde edilmiştir (Çizelge 6). HMF değerleri 82.08-93.96 mg/L arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 6). En yüksek HMF (93.96mg/L) yabanmersini katkılı erik bazlı geleneksel marmelatlarda görülürken, en düşük HMF (82.08mg/L) miktarı kayısı-yabanmersini katkılı erik bazlı geleneksel marmelatlarda tespit edilmiştir. Reçel, Jöle,

Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği'nde hidroksimetilfurfural (HMF) sınırlandırmasına rastlanmamaktadır. Ancak bazı reçel standartlarında 1.sınıf reçellerde bulunması gereken en yüksek HMF değeri 50 mg/kg olarak belirtilirken, ikinci sınıf reçeller için en yüksek HMF değeri 100 mg/kg olarak belirtilmiştir. Sonuç olarak bu tebliğe göre yaptığımız çalışmalarda marmelat örneklerinin 2. sınıf kalitesinde olduğu belirlenmiştir. İnvert şeker değerleri 68.75-75.55 $\mu\text{mol/mL}$ arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek değere (75.556 $\mu\text{mol/mL}$) sahip olan örneğin erik-yabanmersini marmelatı karışımına ait olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 6). Yurdağül (2007), çalışmasında erik marmelatı örneklerinde ortalama invert şeker değerlerinin %19.56-21.89 arasında olduğunu tespit etmiştir.

Çizelge 5. Marmelat Örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Table 5. Physicochemical properties of marmelade samples

Örnekler Samples	pH pH	Suda	Titrasyon Asitliği (g/100 mL) Titratable acidity (g/100 mL)	Su Aktivitesi (a_w) Water activity (a_w)	Kül (%) Ash (%)	Viskozite (cP) Viscosity (cP)
		Çözünür Kuru Madde (°Briks) Total soluble solids (TSS) (°Brix)				
Erik (%100) Plum (%100)	3.84±0.11 ^a	63.6±0.05 ^a	17.41±1.10 ^a	0.854±0.00 ^c	1.55±0.10 ^a	4829.0±11.00 ^a
Erik(%75)- Kayısı(%25) Plum(%100) Apricot (%25)	3.87±0.06 ^a	62.8±0.25 ^c	11.60±0.32 ^c	0.862±0.00 ^a	0.29±0.06 ^b	3874.5±33.5 ^c
Erik(%75)- Yabanmersini(%25) Plum(%75)- Blueberry(%25)	3.68±0.02 ^b	62.8±0.15 ^{bc}	12.17±0.90 ^{bc}	0.862±0.00 ^a	0.15±0.02 ^c	4832.5±6.50 ^a
Erik (%50)- Kayısı (%25)- Yabanmersini (%25) Plum(%50)- Apricot (%25) Blueberry(%25)	3.60±0.00 ^b	63.1±0.10 ^a	13.26±0.76 ^b	0.858±0.858 ^b	0.17±0.07 ^{bc}	4449.0±78.00 ^b

*Sütunlarda farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.
Differences between the examples shown in columns with different lowercase letters are important at 0.05 level.

Çizelge 6. Marmelat Örneklerinin Renk, HMF ve İvert Şeker Değerleri
 Table 6. Color, HMF and invert sugar values of marmelade samples

Örnekler Samples	L* L*	a* a*	b* b*	Hue Hue	Kroma Chroma	HMF (mg/L) HMF (mg/L)	İvert Şeker Invert sugar (μ mol/mL)
Erik (%100) Plum (%100)	1.78±0.08 ^b	1.16±0.06 ^c	1.62±0.01 ^b	54.30±1.35 ^a	2.00±0.05 ^b	87.26±8.70 ^a	68.75±4.797 ^b
Erik(%75)- Kayısı(%25) Plum(%100) Apricot (%25)	1.02±0.29 ^c	1.48±0.00 ^b	1.56±0.29 ^b	45.96±5.57 ^b	2.16±0.21 ^b	83.97±16.13 ^a	69.50±0.801 ^b
Erik(%75)- Yabanmersini(%25) Plum(%75)- Blueberry(%25)	2.13±0.00 ^a	1.36±0.13 ^b	1.78±0.08 ^b	52.76±1.49 ^a	2.24±0.14 ^b	93.96±11.18 ^a	75.55±0.498 ^a
Erik (%50)- Kayısı (%25)- Yabanmersini (%25) Plum(%50)- Apricot (%25) Blueberry(%25)	2.22±0.16 ^a	2.02±0.08 ^a	2.28±0.05 ^a	48.53±1.81 ^{ab}	3.05±0.01 ^a	82.08±10.15 ^a	73.96±2.714 ^{ab}

*Sütunlarda farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.
 Differences between the examples shown in columns with different lowercase letters are important at 0.05 level.

Marmelat örneklerinin toplam fenolik ve toplam flavonoid madde miktarları ile antioksidan aktivite ve viskozite değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Marmelat örneklerinin toplam fenolik madde miktarı değerlerinin 3.26-3.91 mg GAE/g arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 7). Yalın erik marmelat değeri 3.36 mgGAE/g olarak tespit edilmiştir. Yalın erik, erik-kayısı ve erik-yabanmersini marmelatlarının toplam flavonoid madde miktarı değerleri 0.011 mgRE/kg iken erik-kayısı-yabanmersini marmelat karışımlarının değeri 0.010 mgRE/kg olarak tespit edilmiştir (Çizelge 7). Marmelat örneklerinin antioksidan aktivite değerlerinin %58.73-73.04 arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 7). Yalın erik marmelat değeri %66.54 iken en yüksek antioksidan değeri 73.04 ile erik-kayısı karışımı, en düşük antioksidan değeri ise %58.73 ile erik-kayısı-yabanmersini karışımlarında tespit edilmiştir. Yalın erik marmelatın askorbik değeri 49.62 mg/L iken diğer marmelat karışımlarının değerleri 50.64-51.92 mg/L arasında değişiklik göstermişlerdir ($P>0.05$) (Çizelge 7). Marmelat karışımlarının duyu analizi sonuçları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). (Çizelge 8). Duyusal değerlendirmede

örneklerin kazanmış olduğu puanlar dikkate alındığında en çok beğenilen marmelatın 4.46 puan ile erik pulpundan üretilen örnek olduğu ve bunu azalan puan sırasına göre erik-kayısı-yabanmersini, erik-kayısı, erik yabanmersini pulplarından üretilen örneklerin takip ettiği belirlenmiştir.

ÖNERİLER

Araştırmadan elde edilen bulgular, ülkemizde sadece sofralık olarak tüketilen erik meyvesinin ürüne işlenip, alternatif tüketime katkı sağlayarak endüstriyel anlamda değer kazandırılabilceği durumunu ortaya çıkartmıştır. Isıl işlem ve diğer birçok proses, gıdaların kalite parametreleri üzerine etkili faktörlerdendir. Gıdaların sahip oldukları bazı besin öğeleri bu gibi proseslerden fazlaca etkilenmekte ve bu da gıdaların besin değerlerinin azalmasına neden olmaktadır. Günümüzde daha çok geleneksel olarak üretilen marmelatların işleme şartlarının (ısı işlem derecesi ve süresi) iyileştirilmesi, böylece biyoaktif bileşenler ve diğer besin öğelerinin marmelat üretimi esnasında mümkün olduğunca az zarar görmesinin veya optimum düzeyde korunmasının sağlanması ile mümkün olabilir.

Çizelge 7. Marmelat Örneklerinin Toplam Fenolik Madde, Toplam Flavonoid Madde, Antioksidan Aktivite ve Askorbik Asit Değerleri

Table 7. Total phenolics, total flavonoids, antioxidant activity and ascorbic acid values of marmelade samples

Örnekler Samples	Toplam Fenolik (mg GAE/g)	Toplam Flavonoid (mg RE/kg)	Antioksidan Aktivite (%)	Askorbik Asit (mg/L)
	Total phenolics (mg GAE/g)	Total flavonoids (mg RE/kg)	Antioxidant activity (%)	Ascorbic acid (mg/L)
Erik (%100) Plum (%100)	3.36±0.14 ^b	0.011±0.00 ^a	66.54±2.06 ^b	49.62±0.51 ^b
Erik(%75)- Kayısı(%25) Plum(%100) Apricot (%25)	3.91±0.17 ^a	0.011±0.00 ^a	73.04±1.91 ^a	50.64±1.49 ^{ab}
Erik(%75)- Yabanmersini(%25) Plum(%75)- Blueberry(%25)	3.76±0.14 ^a	0.011±0.00 ^a	69.69±0.88 ^{ab}	51.79±0.89 ^a
Erik (%50)- Kayısı (%25)- Yabanmersini (%25) Plum(%50)- Apricot (%25) Blueberry(%25)	3.26±0.21 ^a	0.010±0.00 ^a	58.73±4.52 ^c	51.92±1.02 ^a

*Sütunlarda farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.
Differences between the examples shown in columns with different lowercase letters are important at 0.05 level.

Çizelge 8. Erik Bazlı Geleneksel Marmelat Örneklerinin Duyusal Analiz Değerleri
Table 8. Sensory analysis values of traditional marmelade based plum

Örnekler Samples	Duyusal Özellikler Sensory properties				
	Renk Color	Kıvam Consistency	Koku Smell	Tat ve Lezzet Taste and flavor	Genel İzlenim General impression
Erik (%100) Plum (%100)	4.31±0.85 ^a	4.54±0.66 ^a	3.31±1.32 ^b	4.38±0.77 ^a	4.46±0.52 ^a
Erik(%75)-Kayısı(%25) Plum(%100) Apricot (%25)	4.46±0.8 ^a	4.46±0.66 ^a	3.19±1.22 ^b	4.12±0.92 ^a	4.08±0.86 ^a
Erik(%75)- Yabanmersini(%25) Plum(%75)- Blueberry(%25)	4.23±0.83 ^a	4.62±0.51 ^a	3.31±1.25 ^b	3.81±1.18 ^{ab}	4.08±1.06 ^{ab}
Erik (%50)-Kayısı (%25)- Yabanmersini (%25) Plum(%50)- Apricot (%25) Blueberry(%25)	4.54±0.88 ^a	4.69±0.48 ^a	3.31±1.11 ^b	4.15±1.14 ^a	4.27±1.13 ^a

*Sütunlarda farklı küçük harfler ile gösterilen örnekler arasındaki farklılıklar 0.05 düzeyinde önemlidir.
Differences between the examples shown in columns with different lowercase letters are important at 0.05 level.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde laboratuvar olanaklarından yararlandığımız Kilis 7 Aralık Üniversitesi'ne ve Gıda Mühendisliği Bölümü'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

AACC International (1999). Approved Methods of Analysis. Methods 08-01.01, 44- 19.01, 54-40.02 and 76-31.01. Approved November 3, 1999, eleventh ed. *Am Assoc Cereal Chem International*, St. Paul, MN, USA.

Altuğ, T. (1993). Duyusal Test Teknikleri, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi. Ders Kitapları Yayın No: 28, İzmir, 55s.

Anonymous. (2005a). http://www.lezzet.com.tr/puf_noktaları/00990/ Erişim Tarihi:11.02.2019

Anonymous. (2005b). <http://www.gap.gov.tr/Turkish/Tarim/Meyveyt/erik.html> Erişim Tarihi:11.02.2019.

Anonymous. (2005c). <http://www.ziraatci.com.tr> Erişim Tarihi:16.02.2019

Anonymous. (2006). Türk Gıda Kodeksi Reçel, Jöle, Marmelat ve Tatlandırılmış Kestane Püresi Tebliği, Tebliğ No: 2006/55. Resmi Gazete tarih ve sayısı: 30.12.2006 26392.

Atıcı, G. (2013). Erik Pestilinin Kalite Parametreleri ve Kuruma Davranışları Üzerine 'Sıcak Havalı Kurutma ve Mikrodalga Kurutma' Yöntemlerinin Etkisinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, 108s., Adana.

Cemeroğlu, B., Karadeniz, F., Özkan, M. (2003). Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No:28, (2), 690s, Ankara

Cemeroğlu, B. (2004). Meyve ve Sebze İşletme Teknolojisi. Cilt 1. Kültür ve Turizm Bakanlığı Yayınları, Ankara, 480s.

Cemeroğlu, B. (2007). Gıda analizleri. Kültür ve Turizm Bakanlığı Yayınları, s.167– 172.

Çelik, H. (2006). Karadeniz Bölgesi İçin Yeni Bir Meyve Türü Yaban Mersini (Likapa), II. Ulusal Üzümsü Meyveler Sempozyumu, Eylül, Tokat, Bildiriler kitabı: 124-128.

Gould, A. W. (1977). Food Quality Assurance, The AVI publishing Company Inc. USA, 314p.

Gültekin, H. C. (2010). Antioksidan Meyveler, Ayı Üzümleri (*Vaccinium L.*), Orman ve Av Dergisi, Eylül-Ekim, 5, 49-53.

Kaya, C., Esin Yücel, E., Bayram, M., Meşe, C., Aybakan, E., Gökgez, G., Sözer, T. T. (2016). Trabzon Hurması (*Diospyros kaki L.*) Bazlı Karışık Meyveli Geleneksel Marmelat Üretimi Üzerine Bir Araştırma. *Atatürk Univ., J. of the Agricultural Faculty*, 47 (2): 107-112.

Mercimek Takci, H. A., & Turkmen, F. U. (2016). Extracellular pectinase production and purification from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Int. J. Food Prop.*, 19(11), 2443-2450.

Muradoğlu, F., Pehlivan, M., Gündoğdu, M., Kaya, T. (2011). Iğdır Yöresinde Yetiştirilen Bazı Kayısı (*Prunus armeniaca L.*) Genotiplerin Fizikokimyasal Özellikleri ile Mineral İçerikleri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 1(1), 11-17.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B., Cano, M. P. (2003). Quantitative Bioactive Compounds Assessment and Their Relative Contribution to the Antioxidant Capacity of Commercial Orange Juices, *J. Agric. Food Chem.* 83; 430–439.

Uçan Türkmen, F. ve Mercimek Takci, H. A. (2018). Ultraviolet-C and ultraviolet-B lights effect on black carrot (*Daucus carota ssp. sativus*) juice. *J. Food Meas. Charact.*, 12(2), 1038-1046.

Watts, B.M., Ylimaki, G.L., Jeffery, L.E., Elias, L.G. (1989). Basic Sensory Methods for Food Evaluation. The International Development Research Centre, Ottawa, Canada, 160p.

Yurdağül, E. (2007). Erik Bazlı Karışık Meyveli Geleneksel Marmelat Üretimi Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 34s.

**PEYNİRDEN İZOLE EDİLEN YÜKSEK SEVİYEDE AMİNOGLİKOZİD
DİRENÇLİ ENTEROKOKLARDA VİRÜLENS FAKTÖRLERİN
FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLER İLE ARAŞTIRILMASI***

Degnide Ephrem Adifon, Yasin Tuncer**

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

Geliş / Received: 13.05.2019; Kabul / Accepted: 07.07.2019; Online baskı / Published online: 25.07.2019

Adifon, D.E., Tuncer, Y. (2019). Peynirden izole edilen yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokoklarda virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması. *GIDA* (2019) 44 (4): 719-732 doi: 10.15237/gida.GD19075

Adifon, D.E., Tuncer, Y. (2019). Investigation of virulence factors using phenotypic and genotypic methods in high-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from cheese. *GIDA* (2019) 44 (4): 719-732 doi: 10.15237/gida.GD19075

ÖZ

Bu çalışmanın amacı daha önce peynir örneklerinden izole edilen yüksek-seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) 54 enterokok izolatında virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak araştırılmasıdır. YSAD enterokok izolatlarında α -hemolitik (48.15 %), γ -hemolitik (46.30 %), ve β -hemolitik (5.55 %) aktivite fenotipik olarak belirlendi. Jelatinaz aktivitesi yalnız *E. faecalis* RG22.4, RG26.1 ve RG26.2 suşlarında tespit edildi. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *E. faecium* RS32.2 hariç YSAD enterokok izolatlarında en az bir virülens genin varlığı belirlendi. YSAD enterokok izolatlarında en sık görülen genlerin *acf* (% 88.89), *efaA₅* (% 85.19), *acm* (% 77.78), *gelE* (% 59.2), *cpd* (% 51.85) ve *esp₅* (% 50) olduğu tespit edildi. Fenotipik ve genotipik testler sonucu, 30 YSAD enterokok izolatında sessiz *gelE* geni bulundu. Peynirden izole edilen YSAD enterokok suşlarında yüksek sıklıkla virülens faktör genlerinin tespit edilmesi tüketici sağlığı için endişe uyandırıcıdır.

Anahtar kelimeler: *Enterococcus*, peynir, yüksek seviyede aminoglikozid direnci, virülens faktör, polimeraz zincir reaksiyonu

**INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS USING PHENOTYPIC
AND GENOTYPIC METHODS IN HIGH-LEVEL AMINOGLYCOSIDE
RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATED FROM CHEESE**

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the virulence factors using phenotypic and genotypic methods in 54 high-level aminoglycoside resistant (HLAR) enterococci previously isolated from cheese samples. The α -hemolytic (48.15 %), γ -hemolytic (46.30 %), and β -hemolytic (5.55 %) activities phenotypically were determined in HLAR enterococci. Gelatinase activity was detected in only *E. faecalis* RG22.4, RG26.1, and RG26.2 strains. At least one virulence factor gene was determined using polymerase chain reaction (PCR) in HLAR isolates except *E. faecium* RS32.2. The most frequently virulence genes were detected as *acf* (88.89 %), *efaA₅* (85.19 %), *acm* (77.78 %), *gelE* (59.2 %), *cpd* (51.85 %), and *esp₅* (50 %) in HLAR enterococci isolates. As a result of phenotypic and genotypic tests, silent *gelE* genes were found in 30 HLAR enterococci isolates. Detection of high frequency of virulence factor genes in HLAR enterococci strains isolated from cheese is worrying for consumer health.

Keywords: *Enterococcus*, cheese, high-level aminoglycoside resistance, virulence factor, polymerase chain reaction

* Bu araştırma Degnide Ephrem Adifon'un yüksek lisans tez çalışmasıdır. Bu çalışma International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences Ankara/Türkiye'de poster olarak sunulmuş ve kongre kitabında özet olarak basılmıştır. *This paper is MSc thesis of Degnide Ephrem Adifon. This study was presented as a poster at the International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences Ankara/Turkey, and it was published as an abstract in the book of proceedings.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉ yasintuncer@sdu.edu.tr

☎ (+90) 246 211 1713

☎ (+90) 246 237 0437

GİRİŞ

Enterokoklar, insan ve hayvan bağırsak florasında doğal olarak bulunan ve aynı zamanda çığ gıda maddelerinden ve çeşitli geleneksel fermente gıdalardan sıklıkla izole edilen laktik asit bakterileridir (Foulquié Moreno vd., 2006; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017; Hanchi vd., 2018). Akdeniz ülkelerinde geleneksel peynirlerin mikrobiyotasının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda, enterokokların inek sütüne nazaran yaygın olarak keçi ve koyun sütünden üretilen peynirlerin olgunlaşma sürecinde proteolitik, lipolitik ve sitrat yıkım mekanizmaları ile tipik tat ve aromanın oluşumunda önemli rol oynadıklarını göstermiştir (Foulquié Moreno vd., 2006). Ayrıca, bazı enterokok suşları *Listeria monocytogenes* gibi gıdalarda bulunan patojenlere karşı güçlü antibakteriyel etkiye sahip olmalarından dolayı farklı gıda ürünlerinin muhafazasında koruyucu olarak kullanılmakta ve aynı zamanda probiyotik olarak da kabul edilmektedirler (Hanchi vd., 2018).

Probiyotik ve teknolojik özelliklerine rağmen, bazı enterokok türü üyelerinin antibiyotik direnç ve virülens faktörler gibi tüketici sağlığı için risk teşkil eden özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2019). Enterokoklar endokarditis, bakteriyemi, idrar yolu, merkezi sinir sistemi, karın içi, pelvik ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilen nozokomiyal patojenler olarak da tanımlanmaktadırlar (Reyes vd., 2017). Özellikle *E. faecalis* ve *E. faecium* kaynaklı enfeksiyonlar, Dünya genelinde en sık karşılaşılan klinik enfeksiyonlar arasında yer almaktadır. *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ve *E. raffinosus* kaynaklı enfeksiyonların ise görülme sıklığının daha düşük olduğu belirtilmektedir (Ogier ve Serror, 2008). Son yıllarda gıda kaynaklı enterokokların yaygın aktarılabılır antibiyotik direnç ve virülens faktör geni içermeleri tüketici sağlığı açısından endişe uyandırmaktadır (Inoğlu ve Tuncer, 2013; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017; Demirgöl ve Tuncer, 2017; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2019). Gentamisin ve streptomisin yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde kullanılan

aminoglikozid grubu antibiyotiklerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalar Dünya genelinde gıda ve klinik örneklerden yüksek seviyede aminoglikozid dirençli (YSAD) enterokok suşlarının izole edildiğini göstermiştir (Choi ve Woo, 2013; Niu vd., 2016; Özdemir, 2018; Sparo vd., 2018). Gram pozitif bakterilerde en sık karşılaşılan yüksek seviyede aminoglikozid direnç mekanizması antibiyotığın aminoglikozid modifiye edici enzim ile modifikasyonudur (Bismuth ve Courvalin, 2010; Niu vd., 2016; Sparo vd., 2018). Enterokoklarda tanımlanmış başlıca virülens faktörler agregasyon maddesi, kollojen bağlayan protein, endokarditis spesifik antijeni, enterokokal yüzey proteini, sitolizin, jelatinaz, hiyaluronidaz ve seks feromonlarıdır (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017).

Bu çalışmada, geleneksel peynir örneklerinden izole edilen YSAD 25 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 12 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum* olmak üzere toplam 54 *Enterococcus* suşunda virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda izolatlarda jelatinaz aktivitesi ve hemolitik aktivite fenotipik, virülens faktörleri determine eden *gelE*, *efaAfm*, *efaAfs*, *espfm*, *espsf*, *cdp*, *cob*, *cef*, *cad*, *ace*, *acm*, *agg*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *hyl* genlerinin varlığı ise genotipik olarak araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Enterokok izolatları ve besiyerleri

Çalışma kapsamında Özdemir (2018) tarafından 500 µg/mL gentamisin veya 2000 µg/mL streptomisin içeren de Man Rogosa Sharpe (MRS, LAB M Ltd., Lancashire, UK) agar ve Enterococcosel agar (Becton Dickinson, Almanya) besiyeri ortamları kullanılarak peynir örneklerinden izole edilmiş ve cins ve türe özgü primer çiftleri kullanılarak moleküler düzeyde tanısı yapılmış 18 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 12 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum* izolatının yanı sıra cins düzeyinde tanısı yapılmış ancak türe özgü primerler ile tanısı yapılamamış 7 *Enterococcus* spp. izolatı olmak üzere toplam 54 YSAD *Enterococcus* izolatı kullanılmıştır. Enterokok kültürleri, MRS broth besiyerine % 15 (v/v) steril gliserol ilave edilerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için MRS broth besiyerlerinde 37 °C'de 18 saat geliştirilen YSAD enterokok kültürlerinden 0.5 mL alınmış ve Eppendorf tüplerinde 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Sigma 2-16P, Rotor no: 12148, Almanya) edilmiştir. Daha sonra hücre çökeltisi 0.5 mL liziz tamponu ile çözülmüş ve 37 °C'de 30 dakika su banyosunda (Nüve NB9, Türkiye) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (% 10, w/v) çözeltisi ilave edilmiş ve su banyosunda (Daihan WB-22, Kore) 80 °C'de 10 dakika tutulmuştur. Hücre lizatı üzerine 0.7 mL fenol-kloroform karışımı ilave edilmiş ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir Eppendorf tüpüne alınmış, 0.7 mL 2-propanol ilave edilmiş ve 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pelet 50 µL Tris-EDTA tampon (pH 8.0) ile çözülmüştür (Cancilla vd., 1992). Genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerin agaroz jel elektroforezi % 0.7 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde 85 voltta 1.5 saat süreyle yapılmıştır. Jeller 0.2 µg/mL etidyum bromid (Amresco Inc., Solon, OH, ABD) içeren çözeltide boyanmış ve UV transilluminator (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) üzerinde incelenmiştir. Jel fotoğraflarının çekiminde Nikon D5100 dijital fotoğraf makinesi (Nikon Corp., Japonya) kullanılmıştır.

Enterococcus spp. izolatlarının tür düzeyinde tanısı

Özdemir (2018) tarafından türe özgü primer çiftleri ile tanısı yapılamamış 7 *Enterococcus* spp. (RS21.3, RS25.3, RS29.1, RG22.4, RG26.1, RG26.2 ve RG26.3) izolatının tür düzeyinde tanısı bu çalışma kapsamında 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. 16S rRNA gen bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasında Edwards vd. (1989) tarafından önerilen pA (ileri) 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve pE' (geri) 5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3' primer çifti kullanılmıştır. PZR işlemi 50 µL PZR karışımı kullanılarak (25 µL PCR master mix (2X) (Thermo Scientific #K0172, ABD), 20 µL nükleaz içermeyen su, 3 µL kalıp DNA ve 1'er µL ileri ve geri primer) TurboCycler 2 gradient termal döngü cihazında

(Blue-Ray Biotech Ltd., Tayvan) gerçekleştirilmiştir. PZR işleminde 94 °C'de 2 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 94 °C'de 30 saniye / 55 °C'de 60 saniye / 72 °C'de 90 saniye çoğaltma (30 döngü) ve 72 °C'de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol kullanılmıştır. PZR fragmentlerinin elektroforezi % 1 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmış, etidyum bromid içeren çözeltide boyanmış ve UV ışık üzerinde fotoğraflanmıştır. Amplikon büyüklükleri O'GeneRuler™ 100-bç Plus DNA marker (Thermo #SM1153) kullanılarak hesaplanmıştır. PZR ürünlerinin DNA dizi analizi Oligomer Biyoteknoloji A.Ş. (ODTÜ, Teknokent, Ankara, Türkiye)'inde yaptırılmıştır. Sekans işleminde Applied Biosystems® AB 3730XL (Thermo) otomatik gen sekans cihazı kullanılmıştır. 16S rDNA dizi benzerliği National Center for Biotechnology Information (NCBI) BLAST algoritması kullanılarak tespit edilmiştir.

Jelatinaz aktivitesi

Jelatinaz aktivitesi % 3 (w/v) jelatin (Merck, Darmstadt, Almanya) ilave edilmiş Todd-Hewitt agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, İtalya) besiyeri ortamında test edilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyonu takiben Petri kutuları +4 °C'de 5 saat buzdolabında tutulmuştur. Süre sonunda koloni etrafında bulanık zon oluşumu jelatinaz aktivitesinin pozitif olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001). Denemelerde jelatinaz pozitif *Enterococcus faecalis* NYE7 suşu kontrol olarak kullanılmıştır (İnoğlu ve Tuncer, 2013).

Hemolitik aktivite

Enterokok izolatlarının hemolitik aktivitesi % 5 (v/v) koyun kanı içeren Columbia agar (Liofilchem) besiyeri ortamında test edilmiştir. 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonunda gelişen kolonilerin etrafında berrak zon oluşumu β-, bulanık yeşilimsi zon oluşumu α- ve zon oluşmaması ise γ-hemolitik reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Cariolato vd., 2008). Denemelerde β-hemolitik *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu kontrol olarak kullanılmıştır.

Virülens genlerin tespiti

YSAD enterokok izolatlarında adhezin kollojen (*ace*), agregasyon maddesi (*agg*), hücre duvarı adhezinleri (*efaA_{fs}*, *efaA_{fm}*), hiyaluronidaz (*hyl*), jelatinaz (*gelE*), kollojen bağlayan protein (*ace*, *acm*), seks feromonları (*cef*, *cob*, *cpd*, *cad*), sitolizin (*cyLM*, *cyLB*, *cyLA*) ve ekstraselüler yüzey proteini (*esp_{fs}*, *esp_{fm}*) kodlayan virülens faktör genlerinin varlığı Çizelge 1’de verilen primer çiftleri kullanılarak PZR ile araştırılmıştır. *acm*, *agg*, *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *cdp*, *esp_{fm}*, *esp_{fs}*, *cob*, *cef*, *cad*, *ace*, *cyLM*, *cyLB* ve *cyLA* genlerinin varlığı 95 °C’de 5 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 95 °C’de 30 saniye / 54 °C (*acm* geni için 52 °C, *agg* geni için 56 °C)’de 30 saniye / 72 °C’de 60 saniye çoğaltma (35 döngü) ve 72 °C’de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol

uygulanarak TurboCycler 2 gradient termal döngü cihazı ile araştırılmıştır. Hiyaluronidaz geninin (*hyl*) PZR ile varlığının tespitinde ise 95 °C’de 2 dakika başlangıç denatürasyonu (1 döngü), 95 °C’de 30 saniye / 56 °C’de 90 saniye / 72 °C’de 90 saniye çoğaltma (35 döngü) ve 72 °C’de 10 dakika son uzama (1 döngü) aşamalarından oluşan protokol uygulanmıştır. PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi % 1 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır. Jeller etidyum bromid içeren çözeltide boyanmış, UV ışık üzerinde fotoğraflanmıştır. Fragment büyüklükleri O’GenelRuler™ 100 bç Plus DNA marker (Thermo) kullanılarak hesaplanmıştır. Denemede *E. faecalis* ATCC 29212 suşu (*agg⁺*, *cpd⁺*, *cop⁺*, *cef⁺*, *cad⁺*, *efaA_{fs}⁺*, *gelE⁺*, *cyLM⁺*, *cyLA⁺*, *esp_{fs}⁺*) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 1. Virülens genlerin tespitinde kullanılan PZR primerleri ve ürün büyüklükleri

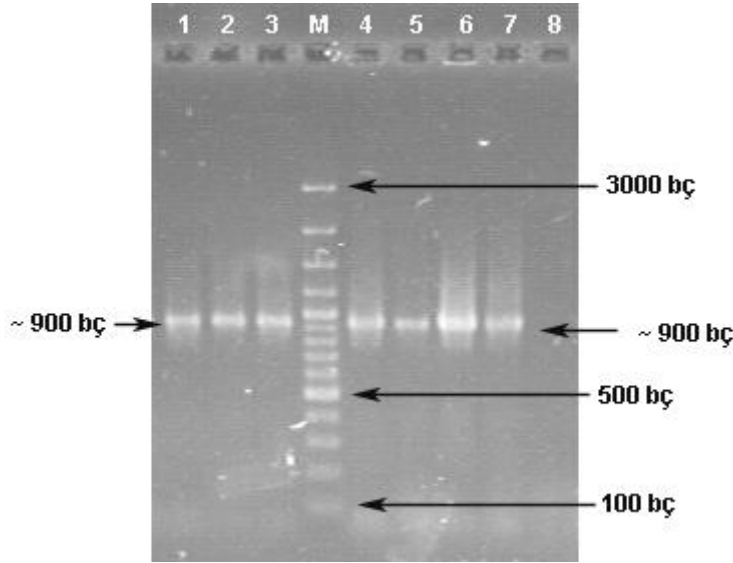
Table 1. PCR primers for detection of virulence genes and product sizes

Gen <i>Gene</i>	Primer sekansları (5' - 3') <i>Primer sequences (5' - 3')</i>	Ürün büyüklüğü (bç) <i>Product size (bp)</i>	Kaynak <i>Reference</i>
<i>gelE</i>	ACC CCG TAT CAT TGG TTT ACG CAT TGC TTT TCC ATC	419	Reviriego vd., 2005
<i>efaA_{fm}</i>	AAC AGA TCC GCA TGA ATA CAT TTC ATC ATC TGA TAG TA	735	Reviriego vd., 2005
<i>efaA_{fs}</i>	GAC AGA CCC TCA CGA ATA AGT TCA TCA TGC TGT AGT A	705	Reviriego vd., 2005
<i>esp_{fm}</i>	TTG CTA ATG CAA GTC ACG TCC GCA TCA ACA CTT GCA TTA CCG AA	955	Reviriego vd., 2005
<i>esp_{fs}</i>	TTG CTA ATG CTA GTC CAC GAC C GCG TCA ACA CTT GCA TTG CCG AA	933	Reviriego vd., 2005
<i>cpd</i>	TGG TGG GTT ATT TTT CAA TTC TAC GGC TCT GGC TTA CTA	782	Reviriego vd., 2005
<i>cob</i>	AAC ATT CAG CAA ACA AAG C GCG TCA TAA AGA GTGGTC AT	1405	Reviriego vd., 2005
<i>cef</i>	GGG AAT TGA GTA GTG AAG AAG AGC CGC TAA AAT CGG TAA AAT	543	Reviriego vd., 2005
<i>cad</i>	TGC TTT GTC ATT GAC AAT CCG ACT TTT TCC CAA CCC CTC AA	1299	Reviriego vd., 2005
<i>ace</i>	AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC TCT ATC ACA TTC GGT TGC G	350	Ben Belgacem vd., 2010
<i>acm</i>	GGC CAG AAA CGT AAC CGA TA CGC TGG GGA AAT CTT GTA AA	353	Camargo vd., 2006
<i>agg</i>	AAG AAA AAG AAG TAG ACC AAC AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA	1553	Eaton ve Gasson, 2001
<i>cyLM</i>	CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT	742	Reviriego vd., 2005
<i>cyLB</i>	ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC	843	Reviriego vd., 2005
<i>cyLA</i>	TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA	517	Reviriego vd., 2005
<i>hyl</i>	ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA	276	Vankerckhoven vd., 2004

BULGULAR VE TARTIŞMA

Yedi YSAD *Enterococcus* spp. izolatının tür düzeyinde tanısı 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile yapılmıştır. pA ve pE' primer çifti kullanılarak yapılan PZR denemesi sonucu izolatların yaklaşık 900 bç büyüklüğünde ampikonlar verdiği belirlenmiştir (Şekil 1). 16S rRNA gen bölgesi

dizilerinin BLAST programında analiz edilmesi sonucu 7 izolatın tamamının *E. faecalis* türü üyesi olduğu belirlenmiştir. 16S rDNA dizi analizinden elde edilen sonuç doğrultusunda çalışma kapsamında 25 *E. faecalis*, 15 *E. faecium*, 12 *E. durans* ve 2 *E. gallinarum* olmak üzere toplam 54 YSAD enterokok izolatı kullanılmıştır.



Şekil 1. YSAD *Enterococcus* spp. İzolatlarında 16S rRNA Geninin PZR Amplifikasyonu

1: RS21.3; 2: RS25.3; 3: RS29.1; M: O'GeneRuler™ 100-bç DNA marker (Thermo); 4: RG22.4; 5: RG26.1; 6: RG26.2; 7: RG26.3; 8: negatif kontrol (su)

Figure 1. PCR Amplification of 16S rRNA Gene in HLAR *Enterococcus* spp. Isolates

1: RS21.3; 2: RS25.3; 3: RS29.1; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 4: RG22.4; 5: RG26.1; 6: RG26.2; 7: RG26.3; 8: negative control (water)

YSAD enterokok izolatlarının virülens faktörlerinin fenotipik olarak belirlenmesinde jelatinaz ve hemolitik aktivite testleri yapılmıştır. 54 YSAD enterokok izolatı arasında yalnız *E. faecalis* RG22.4, RG26.1 ve RG26.2 suşlarının jelatinaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Jelatinaz enterokok suşları tarafından üretilen ve jelatin, kollajen, kazein, hemoglobin, insülin ve bazı bioaktif peptitleri hidrolize edebilen hücre dışı metalloendopeptidazdır (Su vd., 1991). Enterokok suşlarında jelatinaz üretiminin genellikle nozokomiyal, fekal ve klinik izolatlarda daha sık rastlanılan bir virülens faktör olduğu belirlenmiştir (Singh vd., 2009; Consentino vd., 2010). Ancak, jelatinaz üretim özelliğine sahip gıda kaynaklı enterokok suşlarının varlığının bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Eaton ve Gasson, 2001; Franz vd., 2001; Trivedi

vd., 2011; Yogurtcu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015; Avcı ve Özden Tuncer, 2017; Domingos-Lopes vd., 2017; Santos vd., 2017).

Hemolitik aktivite testi sonucu, 54 YSAD enterokok izolatının % 48.15'inin (26/54) α -hemolitik, % 46.30'unun (25/54) γ -hemolitik ve % 5.55'inin (3/54) ise β -hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *E. durans* RG22.2, *E. gallinarum* RG46.2 ve *E. faecium* RS74.1 suşlarının β -hemolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2). Bakteriyel bir toksin olan hemolizin/sitolizin enterokoklar tarafından salgılanan virülens faktörlerden birisidir. Plazı ya da kromozomal DNA üzerinde kodlu olabilen hemolitik aktivite, enfeksiyon şiddetinin artmasında önemli rol oynamaktadır. β -hemolitik

aktivite daha çok *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinin klinik izolatlarında görülmektedir. Gıdalardan β -hemolitik aktiviteye sahip enterokokların izole edilmesi istenilen bir durum değildir (Semedo vd., 2003). β -hemolitik aktivite gösteren enterokok suşlarının fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılmaları önerilmemektedir (Fifadara vd., 2003; Gomes vd., 2008). Farklı araştırmacılar

tarafından yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı enterokoklar arasında β -hemolitik aktivitenin görülmediği ya da α - veya γ - hemolitik aktiviteye nazaran daha düşük sıklıkla gözlemlendiği bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Yüceer ve Özden Tuncer, 2015; Avcı ve Özden Tuncer, 2017; Domingos-Lopes vd., 2017; Gök Charyyev vd., 2019).

Çizelge 2. YSAD enterok suşlarının aminoglikozid direnç paternleri, jelatinaz aktiviteleri, hemolitik aktiviteleri ve virülens faktör genleri

Table 2. *Aminoglycoside resistance patterns, gelatinase activities, hemolytic activities and virulence factor genes of HLAAR enterococci strains*

Bakteriler <i>Bacteria</i>	Aminoglikozid direnç ¹ <i>Aminoglycoside resistance¹</i>	Jelatinaz aktivitesi/ Hemolitik aktivite <i>Gelatinase activity/ Hemolytic activity</i>	Virülens faktör genleri <i>Virulence factor genes</i>
<i>E. faecium</i> RS12.1	CN, S	-/ α	<i>gelE, efaA_βm, efaA_β, ccf, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS21.1	CN, S	-/ α	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS21.2	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS21.3	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS21.4	CN, S	-/ α	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. durans</i> RG22.1	CN, S	-/ α	<i>gelE, efaA_β, ccf, acm, esp_β</i>
<i>E. durans</i> RG22.2	CN, S	-/ β	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm, esp_β</i>
<i>E. faecium</i> RG22.3	CN, S	-/ α	<i>gelE, efaA_βm, efaA_β, ccf</i>
<i>E. faecalis</i> RG22.4	CN, S	+/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm</i>
<i>E. faecalis</i> RS25.1	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS25.2	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS25.3	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS25.4	CN, S	-/ α	<i>efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS25.5	CN, S	-/ α	<i>efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RG26.1	CN, S	+/ γ	<i>gelE, efaA_β, ccf, acm</i>
<i>E. faecalis</i> RG26.2	CN, S	+/ α	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RG26.3	CN, S	-/ γ	<i>efaA_β, acm, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS27.1	CN, S	-/ α	<i>efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β, cylA, cylB</i>
<i>E. faecalis</i> RS27.2	CN, S	-/ γ	<i>efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β, cylA, cylB, agg</i>
<i>E. faecalis</i> RS27.3	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β, agg</i>
<i>E. faecalis</i> RS27.4	CN, S	-/ γ	<i>efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, acm, esp_β, cylA, agg</i>
<i>E. faecalis</i> RS27.5	CN, S	-/ γ	<i>efaA_β, cpd, cob, ace, esp_β, cylA, agg</i>
<i>E. faecalis</i> RS27.6	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, esp_β, cylA, agg</i>
<i>E. faecalis</i> RS29.1	CN, S	-/ γ	<i>efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. faecium</i> RS32.1	CN, S	-/ α	<i>efaA_βm, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RS32.2	S	-/ α	-
<i>E. faecalis</i> RS32.3	S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, acm, esp_β</i>
<i>E. durans</i> RS32.4	CN, S	-/ γ	<i>gelE, ccf</i>
<i>E. faecalis</i> RS32.5	S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, cob, ccf, ace, esp_β</i>
<i>E. faecalis</i> RS32.6	S	-/ α	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, ace, esp_β</i>
<i>E. faecium</i> RS36.1	CN, S	-/ α	<i>gelE, efaA_β, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RS36.2	S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm</i>
<i>E. durans</i> RS36.3	CN, S	-/ γ	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, acm</i>
<i>E. faecalis</i> RS36.4	CN, S	-/ α	<i>gelE, efaA_β, cpd, ccf, esp_β</i>

¹CN: Gentamisin, S: streptomisin.

¹CN: *Gentamicin*, S: *streptomycin*.

Peynirden izole edilen yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokoklar

Çizelge 2. devam
Table 2. continue

Bakteriler <i>Bacteria</i>	Aminoglikozid direnç ¹ <i>Aminoglycoside resistance¹</i>	Jelatinaz aktivitesi/ Hemolitik aktivite <i>Gelatinase activity/ Hemolytic activity</i>	Virülens faktör genleri <i>Virulence factor genes</i>
<i>E. faecium</i> RG36.1	CN, S	-/α	<i>gelE, efaA_{fm}, efaA_{fs}, cpd, ccf, acm</i>
<i>E. durans</i> RS42.1	CN, S	-/α	<i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. durans</i> RS42.2	CN, S	-/α	<i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. durans</i> RS42.3	CN, S	-/α	<i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. durans</i> RS46.1	CN, S	-/α	<i>acm</i>
<i>E. durans</i> RS46.2	CN, S	-/α	<i>efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. durans</i> RS46.3	CN, S	-/α	<i>efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. gallinarum</i> RG46.1	CN, S	-/α	<i>acm, hyl</i>
<i>E. gallinarum</i> RG46.2	CN, S	-/β	<i>ccf, acm, hyl</i>
<i>E. durans</i> RS50.1	CN, S	-/γ	<i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RG52.1	CN, S	-/γ	<i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RG52.2	CN, S	-/α	<i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RG53.1	CN, S	-/α	<i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm, hyl</i>
<i>E. faecium</i> RG53.2	CN, S	-/α	<i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, acm, esp_{fm}, esp_{fs}</i>
<i>E. faecalis</i> RS62.1	CN, S	-/γ	<i>gelE, efaA_{fs}, cpd, ccf, acm, esp_{fs}</i>
<i>E. faecium</i> RG73.1	CN, S	-/γ	<i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RS74.1	CN, S	-/β	<i>efaA_{fm}, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RS74.2	CN, S	-/α	<i>gelE, efaA_{fm}, efaA_{fs}, cpd, ccf, acm</i>
<i>E. durans</i> RS85.1	CN, S	-/γ	<i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i>
<i>E. faecium</i> RS88.1	CN, S	-/γ	<i>gelE, efaA_{fs}, ccf, acm</i>

¹CN: Gentamisin, S: streptomisin.

¹CN: *Gentamicin*, S: *streptomycin*.

YSAD enterokok izolatlarında virülens faktör genlerinin genotipik olarak tespiti, *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *esp_{fm}*, *esp_{fs}*, *cdp*, *cob*, *ccf*, *cad*, *ace*, *acm*, *agg*, *cylM*, *cylB*, *cylA* ve *hyl* genlerine özgü primer çiftleri kullanılarak PZR ile yapılmıştır. PZR denemeleri sonucu 54 YSAD enterokok izolatının % 61.11'inin (33/54) *gelE* geni içerdiği tespit edilmiştir. Franz vd. (2001), peynirden izole edilen enterokok suşlarında yüksek jelatinaz üretim özelliğinin bulunmasını peynirin proteince zengin bir kaynak olmasından ileri gelebileceğini belirtmiştir. Enterokokların ürettikleri bu proteinaz sayesinde gelişmeleri için gerekli olan amino asit kaynağını sağladıklarını bildirmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen bulgular bu düşüncüyü destekler niteliktedir. *E. faecalis* izolatlarında *gelE* geni bulunma sıklığı % 68.00 (17/25), *E. faecium* izolatlarında % 46.67 (7/15) ve *E. durans* izolatlarında % 75 (9/12) olduğu saptanmıştır. *E. gallinarum* izolatlarında *gelE* geni varlığı tespit edilmemiştir (Çizelge 2). Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı enterokok suşlarında sıklıkla *gelE* geni varlığı

bildirilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Cariolato vd., 2008; Özmen Toğay vd., 2010; Inoğlu ve Tuncer, 2013). Diğer taraftan, Yousif vd. (2005), geleneksel bir Afrika fermente gıda maddesi olan Hussuwa'dan izole edilen 22 *E. faecium* suşlarının hiçbirinin *gelE* geni içermediğini rapor etmişlerdir. Süt ve ürünleri orijinli enterokok suşlarının kullanıldığı bir başka çalışmada da *E. faecium* suşlarından hiçbirinde *gelE* geni tespit edilmemiştir (De Perio, 2006). Trivedi vd. (2011), süt, et ve meyve-sebze ürünleri gibi farklı gıda maddelerinden izole ettikleri 250 enterokok suşu içerisinde bir *E. faecium* ve bir *E. faecalis* suşu hariç hiçbirinin *gelE* geni içermediğini bildirmişlerdir. Enterokok suşlarının jelatinaz aktiviteleri ve *gelE* geni varlığı birlikte incelendiği zaman yalnız *E. faecalis* RG22.4, RG26.1 ve RG26.2 suşlarında *gelE* geni varlığının yanı sıra jelatinaz aktivitesinin de görüldüğü tespit edilmiştir. PZR denemeleri sonucu *gelE* geni içerdiği tespit edilen 30 enterokok suşunda ise fenotipik olarak *gelE* geninin ifade edilmediği (sessiz) tespit edilmiştir. Benzer olarak farklı

araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da enterokok suşlarında sessiz *gelE* geni varlığı rapor edilmiştir (Eaton ve Gasson, 2001; Cariolato vd., 2008; Ben Belgacem vd., 2010; Trivedi vd., 2011; Gök Charyyev vd., 2019).

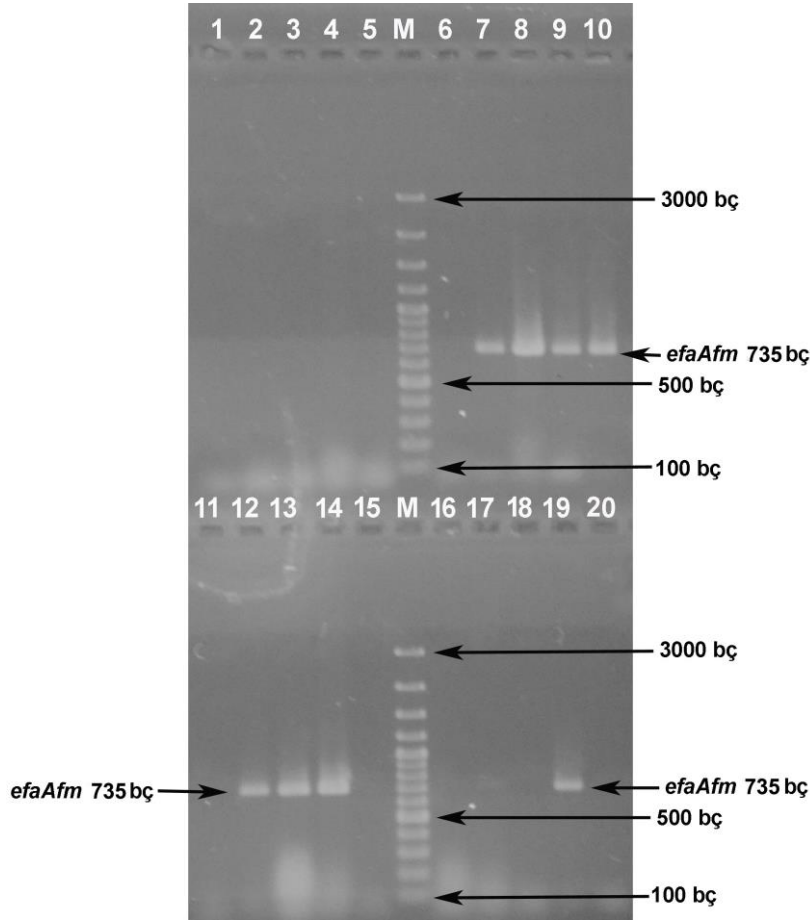
efaA_{fm} ve *efaA_{fs}* genlerinin varlığının araştırıldığı PZR denemeleri sonucu izolatların % 88.88'inin (48/54) *efaA_{fs}* ve % 20.37'sinin (11/54) ise *efaA_{fm}* geni (Şekil 2) içerdiği tespit edilmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı enterokok suşlarında *efaA_{fm}* ve *efaA_{fs}* genlerinin varlığı gösterilmiştir (Reviriego vd., 2005; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Abouelnaga vd., 2016). YSAD *E. faecalis* izolatlarının tamamının *efaA_{fs}* geni içerdiği saptanmıştır. Elde edilen bu bulguya benzer olarak Eaton ve Gasson (2001), starter *E. faecalis* suşlarının tamamının ve gıda izolatu *E. faecalis* suşlarının ise % 89'unun *efaA_{fs}* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Cariolato vd. (2008), *E. faecalis* suşlarının tamamının *efaA_{fs}* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Farklı gıda örneklerinden (et ürünü, peynir, süt ve sebze) izole edilen *E. faecalis* suşlarının yer aldığı başka bir çalışmada 80 *E. faecalis* suşundan % 98.7'sinin *efaA_{fs}* geni içerdiği belirlenmiştir (Gomes vd., 2008). Barbosa vd. (2010), 76 *E. faecalis* suşunun tamamının *efaA_{fs}* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Diğer taraftan Trivedi vd. (2011), süt ve süt ürünlerinden izole ettikleri *E. faecalis* suşlarında daha düşük sıklıkla (% 41.1) *efaA_{fs}* geni bulunduğunu rapor etmişlerdir. *E. faecium* izolatlarının % 73.33'ünde (11/15) *efaA_{fm}* geni varlığı tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara benzer olarak Eaton ve Gasson (2001), 11 *E. faecium* suşundan 9'unun *efaA_{fm}* geni içerdiğini bildirmiştir. Yousif vd. (2005), Husuwa'dan izole edilen 22 *E. faecium* suşunun % 90.9'unun *efaA_{fm}* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Cariolato vd. (2008), süt ve süt ürünlerinden izole edilen 25 *E. faecium* suşunun tamamının *efaA_{fm}* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Türkiye'de yapılan iki farklı çalışmada ise fermente sosis, peynir ve zeytin örneklerinden izole edilen 16 *E. faecium* suşundan % 67'sinin (Özmen Toğay vd., 2010) ve Tulum peynirinden izole edilen bakteriyosin üreticisi 3 *E. faecium* suşunun tamamının *efaA_{fm}* geni içerdiği (Özden Tuncer vd., 2013) rapor edilmiştir. Diğer taraftan Ben Belgacem vd. (2010), starter kültür

kullanılmadan üretilen geleneksel Tunus fermente et ürününden izole ettikleri *E. faecium* suşlarının yalnız % 20.8'inin *efaA_{fm}* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Çalışma kapsamında kullanılan 12 *E. durans* suşu içerisinde hiçbirinin *efaA_{fm}* geni içermediği tespit edilirken, 10'unun (RG22.1, RG22.2, RS36.3, RS42.1, RS42.2, RS42.3, RS46.2, RS46.3, RS50.1 ve RS85.1) *efaA_{fs}* geni içerdiği saptanmıştır (Çizelge 2). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da gıda orijinli *E. durans* suşlarında *efaA_{fs}* geni varlığı rapor edilmiştir (De Perio vd., 2006; Dworkin vd., 2006). PZR ile *efaA_{fm}* ve *efaA_{fs}* genlerinin varlığının araştırıldığı enterokok izolatları içerisinde 10 *E. faecium* (RS12.1, RG22.3, RG36.1, RG52.1, RG52.2, RG53.1, RG53.2, RG73.1, RS74.1 ve RS74.2) suşunun her iki geni de içerdiği belirlenmiştir (Çizelge 2). *E. faecium* suşları içerisinde hem *efaA_{fm}* hem de *efaA_{fs}* geni bulundurma oranı % 66.6 olarak tespit edilmiştir. *E. faecalis* suşları arasında her iki geni de içeren bir suşa rastlanılmamıştır. Adhezin benzeri *E. faecalis* ve *E. faecium* endokarditis antijenleri potansiyel virülens faktörler olarak nitelendirilmektedir. *efaA_{fs}* geninin patojenite üzerine etkisi hayvan modellerinde tespit edilmiş ancak *efaA_{fm}* geninin patojenite üzerindeki rolü henüz belirlenmemiştir (Dworkin vd., 2006; Cariolato vd., 2008; Ben Belgacem vd., 2010). Bu nedenle çalışma kapsamında *efaA_{fs}* geni içerdiği tespit edilen YSAD enterokok izolatlarının tüketici sağlığı açısından risk teşkil etme potansiyeli bulunmaktadır.

YSAD enterokok izolatlarında seks feromon (*cdp*, *cob*, *ccf* ve *cad*) genlerinin varlığının araştırıldığı PZR çalışmaları sonucu izolatların % 88.89'unda (48/54) *ccf*, % 51.85'inde (28/54) *cdp* ve % 9.26'sında (5/54) *cob* geni varlığı saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde *cad* geni varlığı tespit edilmemiştir. *ccf* geni bulunma sıklığı *E. faecalis* için % 94.44 (23/25), *E. durans* için % 91.66 (11/12), *E. faecium* için % 86.6 (13/15) ve *E. gallinarum* için ise % 50 (1/2) olduğu tespit edilmiştir. *E. faecalis* izolatlarının % 92'sinde (23/25), *E. faecium* izolatlarının % 20'sinde (3/15) ve *E. durans* izolatlarının % 16.67'sinde (2/12) *cdp* geni varlığı belirlenmiştir. *E. gallinarum* suşlarında ise *cdp* geni tespit edilmemiştir. Enterokok izolatlarında *cob*

geni bulunma sıklığı % 9.2 olarak saptanmıştır. *cob* geni varlığı sadece *E. faecalis* RS27.4, RS27.5, RS27.6 ve RS32.5 suşlarında tespit edilmiştir. Seks feromonları, enterokok suşları arasında plazmid DNA'nın konjugatif transferini kolaylaştıran küçük hidrofobik peptitlerdir. Seks feromonları virülens faktör olarak değerlendirilmemelerine

rağmen, enterokok suşlarında seks feromonlarının üretimi virülens determinantların ve antibiyotik direncin feromon yanıt veren konjugatif plazmidler aracılığı ile diğer enterokok suşlarına yayılmasını teşvik etmektedir (Eaton ve Gasson, 2001; Klare vd., 2003; Inoğlu ve Tuncer, 2013; Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017).



Şekil 2. Bazı YSAD *Enterococcus* Suşlarında *efaA_{fm}* Geninin PZR Amplifikasyonu

1: *E. durans* RS46.1; 2: *E. durans* RS46.2; 3: *E. durans* RS46.3; 4: *E. gallinarum* RG46.1; 5: *E. gallinarum* RG46.2; M: O'GeneRuler™ 100-bç DNA marker (Thermo); 6: *E. durans* RS50.1; 7: *E. faecium* RG52.1; 8: *E. faecium* RG52.2; 9: *E. faecium* RG53.1; 10: *E. faecium* RG53.2; 11: *E. faecalis* RS62.1; 12: *E. faecium* RG73.1; 13: *E. faecium* RS74.1; 14: *E. faecium* RS74.2; 15: *E. durans* RS85.1; 16: *E. faecium* RS88.1; 17: *E. faecalis* ATCC 29212 (negatif kontrol); 18: *E. faecalis* ATCC 51299 (negatif kontrol); 19: *E. faecium* ATCC 51599 (pozitif kontrol); 20: negatif kontrol (su)

Figure 2. PCR Amplification of *efaA_{fm}* Gene in Some HILAR *Enterococcus* Strains

1: *E. durans* RS46.1; 2: *E. durans* RS46.2; 3: *E. durans* RS46.3; 4: *E. gallinarum* RG46.1; 5: *E. gallinarum* RG46.2; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 6: *E. durans* RS50.1; 7: *E. faecium* RG52.1; 8: *E. faecium* RG52.2; 9: *E. faecium* RG53.1; 10: *E. faecium* RG53.2; 11: *E. faecalis* RS62.1; 12: *E. faecium* RG73.1; 13: *E. faecium* RS74.1; 14: *E. faecium* RS74.2; 15: *E. durans* RS85.1; 16: *E. faecium* RS88.1; 17: *E. faecalis* ATCC 29212 (negative control); 18: *E. faecalis* ATCC 51299 (negative control); 19: *E. faecium* ATCC 51599 (positive control); 20: negative control (water)

esp_{fm} ve *esp_f* genlerinin varlığının araştırıldığı PZR denemeleri sonucu 54 YSAD enterokok suşundan 27'sinin (% 50) *esp_f* geni içerdiği tespit edilmiştir. *esp_{fm}* geni varlığı ise sadece *E. faecium* RG53.2 suşunda belirlenmiştir. *E. faecium* RG53.2 suşunun aynı zamanda her iki *esp* genini de içeren tek suş olduğu saptanmıştır. *E. gallinarum* suşlarının hiçbirinde (0/2) *esp* geni varlığı tespit edilmemiştir (Çizelge 2). *esp_f* geninin *E. faecalis* suşlarında, *E. faecium* ve *E. durans* suşlarına nazaran daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. *esp_f* geni bulunma sıklığının *E. faecalis* suşlarında % 94.44 (23/25), *E. durans* ve *E. faecium* suşlarında ise sırasıyla % 16.67 (2/12) ve % 13.33 (2/15) olduğu saptanmıştır. Geçmiş yıllarda gıda kaynaklı enterokok suşlarının kullanıldığı çalışmalarda elde edilen bulguların aksine YSAD enterokok suşlarında *esp* geni bulunma sıklığı yüksek bulunmuştur. Eaton ve Gasson (2001), gıda kökenli *E. faecium* suşlarının hiçbirinin, *E. faecalis* suşlarının ise % 33'ünün *esp* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Franz vd. (2001), 48 *E. faecium* suşundan sadece 1'inin (% 2.1) *esp* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada tulum peynirinden izole edilen *E. faecalis* suşlarının % 57'sinde ve *E. faecium* suşlarının ise % 4.8'inde *esp* geni varlığı tespit edilmiştir (İnoğlu ve Tuncer, 2013). Enterokok suşlarında ekstraselüler yüzey proteini üretimi hücre hidrofobitesini, abiyotik yüzeylere tutunmayı ve biofilm oluşumunu arttırmaktadır. Yapılan çalışmalar yüzey proteini varlığı ile antibiyotik direnci arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (Chajęcka-Wierzchowska vd., 2017). Ekstraselüler yüzey proteini üreten enterokok suşlarının gıdalarda starter kültür olarak kullanımı istenilmemektedir (Franz vd., 2001). Bu nedenle *esp* geni içerdiği tespit edilen 23 *E. faecalis* ve bir *E. faecium* suşunun tüketici sağlığı açısından risk oluşturma potansiyeli bulunmaktadır.

PZR denemeleri sonucu 54 YSAD enterokok suşu arasından 5 (% 9.26) *E. faecalis* suşunun *agg* genini içerdiği tespit edilmiştir. *E. faecium*, *E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarının hiçbirinde *agg* geni varlığı belirlenmemiştir (Çizelge 2). Eaton ve Gasson (2001), Pérez-Pulido vd. (2006) ve Ben Belgacem vd. (2010) tarafında yapılan çalışmalarda da gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. durans* suşlarında *agg* geni varlığı tespit

edilmemiştir Diğer taraftan, gıda kaynaklı *E. faecium* suşlarında *agg* geni varlığının bildirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (Semedo vd., 2003; İnoğlu ve Tuncer, 2013). Çalışma kapsamında *agg* geni içerdiği tespit edilen *E. faecalis* RS27.2, RS27.3, RS27.4, RS27.5 ve RS27.6 suşlarının tamamının aynı zamanda seks feromon geni de içerdiği tespit edilmiştir (Çizelge 2). Eaton ve Gasson (2001) da *agg* geni içeren suşların mutlaka seks feromon determinantlarını da içerdiğini bildirmiştir.

ace ve *acm* genlerinin araştırıldığı PZR denemeleri sonucu 25 *E. faecalis* suşundan 20'sinin *ace* geni içerdiği, *E. faecium*, *E. durans* ve *E. gallinarum* suşlarının ise hiçbirinin *ace* geni içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 2). *E. faecalis* suşlarının % 64'ünün (16/25), *E. faecium* suşlarının % 86.67'sinin (13/15), *E. durans* suşlarının % 91.67'sinin (11/12) ve *E. gallinarum* suşlarının tamamının (2/2) *acm* geni içerdiği tespit edilmiştir. Enterokok suşlarında *ace* geni bulunma sıklığı % 37.04 (20/54) ve *acm* geni bulunma sıklığı ise % 77.78 (42/54) olarak hesaplanmıştır. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da gıda kökenli enterokok suşlarında adhezin kollojen determine eden genlerin varlığı gösterilmiştir (Pérez-Pulido vd., 2006; Gomez vd., 2008; Trivedi vd., 2011). Diğer taraftan Ben Belgacem vd. (2010) ve İnoğlu ve Tuncer (2013) gıda kaynaklı enterokok suşlarında *ace* geni varlığını tespit etmediklerini rapor etmişlerdir.

Sitolizin (*cylM*, *cylB* ve *cylA*) genlerinin araştırıldığı PZR denemeleri sonucu *E. faecalis* RS27.1 ve RS27.2 suşlarında *cylB* ve *E. faecalis* RS27.1, RS27.2, RS27.4, RS27.5 ve RS27.6 suşlarında ise *cylA* geni varlığı tespit edilirken, hiçbir suşta *cylM* geni varlığı tespit edilmemiştir (Çizelge 2). Enterokok suşlarında *cylB* geni bulunma sıklığı % 3.7, *cylA* geni bulunma sıklığı ise % 9.2 olarak saptanmıştır. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda gıda kaynaklı *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarında *cylM*, *cylB* ve *cylA* geni varlığı bildirilmiştir (Pérez-Pulido vd., 2006; Ben Belgacem vd., 2010; Trivedi vd., 2011). Diğer taraftan, Eaton ve Gasson (2001) gıda kökenli *E. faecium* suşlarının hiçbirinin sitolizin geni içermediğini ancak, bazı *E. faecalis* suşlarının ise her üç geni de içerdiğini

bildirmişlerdir. Yousif vd. (2005) Hussuwa'dan izole edilen 22 *E. faecium* suşundan hiçbirinin sitolizin geni içermediğini rapor etmişlerdir. Benzer olarak Türkiye'de Tulum peynirinden izole edilen *E. faecium* ve *E. faecalis* suşlarından hiçbirinin sitolizin geni içermediği bildirilmiştir (Inoğlu ve Tuncer, 2013).

Hiyaluronidaz (*hyl*) geni varlığının araştırıldığı PZR denemeleri sonucu *E. gallinarum* RG46.1, RG46.2 ve *E. faecium* RG53.1 suşlarında *hyl* geni varlığı tespit edilmiştir. *E. faecalis* ve *E. durans* suşlarının hiçbirinde ise *hyl* geni varlığı saptanmamıştır (Çizelge 2). Enterokok suşlarında *hyl* geni bulunma sıklığı % 5.5 (3/54) olarak hesaplanmıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise 116 klinik *E. faecium* ve *E. faecalis* suşunun % 12.9'unun *hyl* geni içerdiği bildirilmiştir (Saba vd., 2016).

SONUÇ

Bu çalışmada, peynir örneklerinden izole edilmiş 54 YSAD enterokok suşunda virülens faktör varlığı fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılmıştır. PZR denemeleri sonucu *E. faecium* RS32.2 suşu hariç tüm YSAD enterokok izolatlarında en az bir virülens faktör geni varlığı tespit edilmiştir. Peynir örneklerinden izole edilen enterokok suşlarının yüksek seviyede aminoglikozid direncinin yanı sıra çok sayıda virülens faktör geni içermeleri tüketici sağlığı açısından endişe uyandırıcıdır. Bu sonuçlar fermente gıda üretiminde starter kültür olarak kullanılacak enterokok suşlarının seçiminde endüstriyel özelliklerinin yanı sıra dikkatli bir güvenlik değerlendirmesi gerektirdiğini de ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 5085-YL1-17 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederiz. Degnide Ephrem Adifon yüksek lisans eğitimi sürecinde maddi olarak Benin Bursları Ulusal Müdürlüğü ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abouelnaga, M., Lamas, A., Quintela-Baluja, M., Osman, M., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M. (2016). Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from fermented and unfermented foods. *Ann Microbiol*, 66, 577-585.
- Avcı, M., Özden-Tuncer, B. (2017). Safety evaluation of enterocin producer *Enterococcus* sp. strains isolated from traditional Turkish cheeses. *Pol J Microbiol*, 2, 223-233.
- Barbosa, J., Gibbs, P.A., Teixeira, P. (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the north of Portugal. *Food Control*, 21, 651-656.
- Ben Belgacem, Z., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez-Canamero, M., Galvez, A., Manai, M. (2010). Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food Control*, 21(4), 462-470.
- Bismuth, R., Courvalin, P. (2010). Aminoglycosides and Gram-positive bacteria. In *Antibiogram*, Courvalin, P., Leclercq, R. Rice, L. (eds), ESKA, Portland, Oregon, the USA, pp. 225-242.
- Camargo, I.L.B.C., Gilmore, M.S., Darini, A.L.C. (2006) Multilocus sequence typing and analysis of putative virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* isolates from Brazil. *Clin Microbiol Infect*, 12, 1123-1130
- Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with ³²P and fluorescent labels. *Appl Environ Microbiol*, 58, 1772-1775.
- Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and

- human samples in North Italy. *Food Control*, 19, 886-892.
- Chajęcka-Wierzychowska, W., Zandernowska, A., Łaniewska-Trokenheim, Ł. (2017). Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *LWT-Food Sci Technol*, 75, 670-676.
- Chajęcka-Wierzychowska, W., Zandernowska, A., Zarzecka, U., Zakrzewski, A., Gajewska, J. (2019). Enterococci from ready-to-eat food – horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes and genotypic characterization by PCR melting profile. *J Sci Food Agric*, 99, 1172-1179.
- Choi, J-M., Woo, G-J. (2013). Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *Int J Food Microbiol*, 165, 1-6.
- Consentino, S., Podda, G.S., Corda, A., Fadda, M.E., Deplano, M., Pisano, M.B. (2010). Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. *J Prev Med Hyg*, 1, 31-36.
- De Perio, M.A., Yarnold, P.R., Warren, J., Noskin, G.A. (2006). Risk factors and outcomes associated with non-*Enterococcus faecalis*, non-*Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 27, 28-33.
- Demirgöl, F., Tuncer, Y. (2017). Detection of antibiotic resistance and resistance genes in enterococci isolated from sucuk, a traditional Turkish dry-fermented sausage. *Korean J Food Sci An*, 37(5), 670-681.
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *J Food Microbiol*, 63, 178-190
- Dworkin, M., Briana, K.K., Dunny, G.M. (2006). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity. *Int J Med Microbiol*, 296, 141-147.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67, 1628-1635.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*, 17, 7843-7853.
- Fifadara, N., Radu, S., Hassan, Z., Beuchat, L.R., Rusul, G. (2003). Hemolytic and nonhemolytic vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from beef important to Malaysia. *J Food Prot*, 66(10), 1845-1850.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106, 1-24.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*, 67, 4385-4389.
- Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco, B.D., De Martinis, E.C. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*, 25, 668-675.
- Gök Charyyev, M., Özden Tuncer, B., Akpınar Kankaya, D., Tuncer, Y. (2019). Bacteriocinogenic properties and safety evaluation of *Enterococcus faecium* YT52 isolated from boza, a traditional cereal based fermented beverage. *J. Consum. Prot. Food Saf.*, 14(1), 41-53.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-an update. *Front Microbiol*, 9, 1791.
- Inoğlu, Z.N., Tuncer, Y. (2013). Safety assessment of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from Turkish tulum cheese. *J Food Safety*, 33, 369-377.
- Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G., Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol*, 88, 269-290.

- Niu, H., Yu, H., Hu, T., Tian, G., Zhang, L., Guo, X., Hu, H., Wang, Z. (2016). The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Braz J Microbiol*, 47, 691-696.
- Ogier, J.C., Seror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol*, 126, 291-301.
- Özdemir, R. (2018). Süt ve süt ürünlerinde yüksek seviyede aminoglikozid dirençli *Enterococcus* spp. yaygınlığı ve aminoglikozid-modifiye edici enzim (AME) genlerinin belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Isparta, Türkiye, 105 s.
- Özden Tuncer, B., Ay, Z., Tuncer, Y. (2013). Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Türk J Biol*, 37, 443-449.
- Özmen Toğay, S., Çelebi Keskin, A., Açıık, L., Temiz, A. (2010). Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J Appl Microbiol*, 109, 1084-1092.
- Pérez-Pulido, R., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Martinez, M., Galvez, A. (2006). Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem Toxicol*, 44, 2070-2077.
- Reviriego, C., Eaton, T., Martín, R., Jiménez, E., Fernández, L., Gasson, M.J., Rodríguez, J.M. (2005). Screening of virulence determinants of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *J Hum Lact*, 21, 131-137.
- Reyes, K., Zervos, M., John, J. (2017). Enterococcal infections in adults. In: *Antimicrobial Drug Resistance*. Mayers, D.L., Sobel, J.D., Ouellette, M., Kaye, K.S., Marchaim, D. (eds), Clinical and Epidemiological Aspects, Volume 2, Springer International Publishing, Berlin, pp. 811-818.
- Saba Çopur Ş., Şahin, F., Göçmen, J.S. (2016). Determination of virulence and multidrug resistance genes with polymerase chain reaction method in vancomycin-sensitive and -resistant enterococci isolated from clinical samples. *Türk J Med Sci*, 46(3), 877-891.
- Santos, S.C., Fraqueza, M.J., Elias, M., Barreto, A.S., Semedo-Lemsaddek, T. (2017). Traditional dry smoked fermented meat sausages: characterization of autochthonous enterococci. *LWT-Food Sci Technol*, 79, 410-415
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F.S., Marques, J.J.F., Crespo, M.T.B., Tenreiro, R. (2003). Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol*, 26, 13-22.
- Singh, K.V., Nallapareddy, S.R., Murray, B.A. (2007). Importance of the *ebp* (endocarditis-and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. *J Infect Dis*, 195, 1671-1677.
- Sparo, M., Delpech, G., Garcia Allende, N. (2018). Impact on public health of the spread on high-level resistance to gentamicin and vancomycin in enterococci. *Front Microbiol*, 9, 3073.
- Su, Y.A., Sulavik, M.C., He, P., Makinen, K.K., Makinen, P.L., Fiedler, S., Wirth, R., Clewell, D.B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun*, 59, 415-420.
- Trivedi, K., Cupakova, S., Karpiskova, R. (2011). Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med Czech*, 56, 352-357.
- Vankerkhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., Goossens, H. (2004). Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4473-4479.
- Yogurtcu, N.N., Tuncer, Y. (2013). Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains

isolated from Turkish tulum cheese. *Int J Dairy Technol*, 66, 236-242.

Yousif, N.M.K., Dawyndt, P, Abriouel, H., Wijaya, A., Schillinger, U., Vancanneyt, M., Swing, J., Dirar, H.A., Holzapfel, W.H., Franz, C.M.A.P. (2005). Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from 'Hussuwa', an African fermented sorghum product. *J Appl Microbiol*, 98, 216-228.

Yüceer, Ö., Özden Tuncer, B. (2015). Determination of antibiotic resistance and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from fermented Turkish sausage (sucuk). *J Food Safety*, 35, 276-285.

GELENEKSEL GIDALARDAN DARTI'NIN ÜRETİM YÖNTEMİ VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Öznur Cumhur*

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Bilecik, Türkiye

Geliş / *Received*: 18.01.2019; Kabul / *Accepted*: 18.07.2019; Online baskı / *Published online*: 26.07.2019

Cumhur, Ö. (2019). Geleneksel gıdalardan dartı'nın üretim yöntemi ve bazı özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2019) 44 (4): 733-741 doi: 10.15237/gida.GD19024

Cumhur, Ö. (2019). Determination of production method and some characteristics of dartı from traditional foods. GIDA (2019) 44 (4): 733-741 doi: 10.15237/gida.GD19024

ÖZ

Bu çalışmada, geleneksel bir gıda olan dartının üretiminin kayıt altına alınması, bileşim ve duyuşal özelliklerinin belirlenmesi, ürünün kalitesini kaybetmeden üretilmesi ve zamanla kaybolmasının önlenmesi hedeflenmiştir. Dartı; çiğ süt kremasından pişirilerek yapılan, kendine özgü tat ve aroması olan geleneksel bir gıdadır. Ürün yaygın olarak kahvaltıda tüketilmekte; pilav, makarna ve yöresel bir ürün olan keşekte sos olarak kullanılmakta veya yemek ve hamur işlerinde yağ olarak ikame edilmektedir. Çalışma kapsamında dartının üretimi incelenmiş, tuzlu ve tuzsuz olarak üretilen ürünün kontrollü şartlarda geleneksel üretimi gerçekleştirilmiştir. Ürünlerde kül, kuru madde, protein, yağ, pH, titrasyon asitliği analizleri yapılmış ve duyuşal özellikleri değerlendirilmiştir. Tuzlu olarak üretilen üründe kül, kuru madde, protein, yağ, pH ve titrasyon asitliği değerleri sırasıyla %2.66, %85.93, %8.61, %66.33, 4.34 ve %1.05 olarak bulunmuştur. Ürünü tanımayan tüketicilere uygulanan duyuşal analiz sonuçlarına göre; dartı genel olarak görünüş, koku, kıvam ve yapı açısından orta düzeyde beğenilirken; tat olarak en yüksek puanı alarak tüketicinin beğenisini kazanmıştır.

Anahtar kelimeler: Geleneksel gıda, dartı, kaymak kavurması.

DETERMINATION OF PRODUCTION METHOD AND SOME CHARACTERISTICS OF DARTI FROM TRADITIONAL FOODS

ABSTRACT

In this study, it is aimed to record the production of dartı, which is a traditional food, to determine the composition and sensory properties of it, to produce without losing the quality of the product and to prevent its disappearance in time. Dartı with its own taste and flavor, is made by cooking raw milk cream. The traditional food is widely consumed in the breakfast, served as a sauce on rice, pasta, and a local product keşek or substituted fat for food and pastries. In the study, production of dartı was investigated and traditional production of the salted and unsalted product was carried out under controlled conditions. The ash, dry matter, protein, fat, pH, titration acidity of the products were studied and their sensory properties were evaluated. The ash, dry matter, protein, fat, pH and titration acidity values of the traditional food produced as salty were found to be as %2.66, %85.93, %8.61, %66.33, 4.34 and %1.05, respectively. According to the sensory analysis results applied to consumers who do not know the product; dartı moderately evaluated in terms of appearance, smell, consistency and structure; got the highest score regarding the taste and won the appreciation of consumers.

Keywords: Traditional foods, dartı, roasted cream.

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ oznur.cumhur@bilecik.edu.tr

☎ (+90) 228 214 1985

☎ (+90) 228 214 1302

GİRİŞ

Gastronomik mirasın bir parçası olan geleneksel gıdalar, gıda pazarında yer alan çok fazla çeşitlilikteki ürünlerin arasında tüketiciler tarafından tercih edilen ve pazarda büyüyen bir alanı temsil etmektedir. Tüketiciler geleneksel gıdaları sağlıklı, besleyici, güvenli, yüksek kaliteli, lezzetli, doğal, çevre dostu, benzersizlik gibi gıda tüketimi açısından olumlu özelliklerle ilişkilendirmekte ve bu durum ürünlere pazarda bir avantaj sağlamaktadır (Trichopoulou vd., 2007; Belc vd., 2016; Onurlubaş ve Taşdan, 2017). Geleneksel gıdalarda geleneksel malzemelerin kullanılması; üretim, sunum, tüketim ve/veya saklama koşullarının coğrafyaya özgü olması ürünü pazardaki diğer ürünlerden farklılaştırmakta ve ürüne ayırt edici özellikler kazandırmaktadır (Cumhur, 2017).

Dartı Kocaeli, Sakarya, İzmir ve Antalya gibi yörelerde Manav kültüründeki insanlar tarafından aile ekonomisi içerisinde çığ inek sütü kremasından pişirilerek yapılan, pişirmeden dolayı kendine has tat ve aroması olan geleneksel bir süt ürünüdür. Ürün yaygın olarak kahvaltıda ekmele tüketilirken; pilav, makarna ve yöresel bir yemek olan keşekte sos olarak sunulmakta; hamur işleri, yumurta ve yemeklerde yağ olarak ikame etmektedir (Cumhur, 2018). Dartının hammaddesinin süt yağının oluşturduğu kaymak olması ve üretim aşamasında kaymakla beraber olan süt bileşenlerinin kavrulması sebebiyle ürün kaymak kavurması olarak da adlandırılmaktadır. Ayrıca ürün farklı yörelerde tartı, süt katığı gibi isimlerle de anılmaktadır.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de geleneksel gıdalar değişen teknoloji ve tektipleşen beslenme alışkanlıkları nedeniyle yok olma riski altındadır. Bu nedenle, kültürümüzün bir parçası olan geleneksel gıdaları incelemek ve belgelemek önemlidir. Bu bağlamda geleneksel gıdalarla ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Ancak dartıyla ilgili tarama yapıldığında az sayıda çalışmada ürün yer almaktadır.

Türk Patent Enstitüsü'nün coğrafi işaret tescil belgesi verdiği "Adapazarı Dartılı Keşkek" yöresel yemeğinde üründen yardımcı eleman olarak bahsedilirken (Anonymous, 2009); "Akçakoca

Melengüceği Tatlısı"nda üründen tatlının içinde süt kaymağının kızartılması sonucunda elde edilen ve tatlıya asıl lezzetini veren iç malzeme olarak bahsedilmektedir (Anonymous, 2017). Kocaeli ve Kandıra yöresine ait gastronomik lezzetlerle ilgili yapılan çalışmalarda da dartının mutfakta hangi yemeklerde kullanıldığından ve yapımından temel düzeyde bahsedilmektedir (Alyakut & Üzümcü, 2017; Üzümcü vd., 2017). Dartıyla ilgili ürün bazında yapılan nitel ve gözleme dayalı çalışmada ise geleneksel üründen, üretiminden, mutfakta kullanıldığı yiyeceklerden ve hangi kültüre ait olduğundan bahsedilmektedir (Cumhur, 2018).

Bu çalışmada, dartı üreticileri ile birlikte geleneksel olarak üretimi yapılmış ve üretim yöntemi kayıt altına alınmıştır. Geleneksel üretimin kontrollü şartlarda yapıldığı örneklerde bazı fiziksel, kimyasal ve duyuşsal analizler yapılarak geleneksel ürüne özgü karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Fiziksel ve kimyasal sonuçlar, geleneksel ürünle aynı hammaddeden üretilen kaymak ile karşılaştırılmıştır. Böylece geleneksel bir gıda olan dartının kalitesini kaybetmeden üretiminin sağlanması, ürüne standart kazandırılması adına kaynak oluşturulması ve tüketiciler tarafından ürünün duyuşsal olarak değerlendirilmesi sağlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Dartının geleneksel üretim şeklinin belirlenmesi

Çalışmada geleneksel olarak üretilen dartıyla ilgili üreticilerden bilgiler temin edilmiş, üretim aşamaları gözlemlenmiş ve üretim kayıt altına alınmıştır. Geleneksel dartının üretimi Manav kültürüne özgü olduğu için, ilgili araştırma özellikle ürün üretiminin yaygın olarak yapıldığı ve Manav kültürünün hakim olduğu Sakarya'da yapılmıştır. Ürün üretiminde kullanılan çığ süt kreması ve tuz miktarı, üretim sırasındaki sıcaklık (TFA 14.1503 Dijital Termometre) ve süre gibi üretim koşulları belirlenmiştir. Ardından ürün üretimini bilen ve yapan iki kişi tarafından üç ayrı zamanda geleneksel gıdanın üretimi tuzlu ve tuzsuz olarak kontrollü şartlarda gerçekleştirilmiştir. Dartı örnekleri analizleri yapılabildiği kadar buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiş ve tüm analizler 5 gün içerisinde tamamlanmıştır.

Çiğ süt kreması ve kontrollü şartlarda üretilen dartıda yapılan bileşim analizleri

Hammadde olarak kullanılan çiğ süt kreması ve kontrollü şartlarda üretilen tuzlu ve tuzsuz dartı örneklerinde kuru madde tayini TS 1018'de belirtilen gravimetrik yöntemle (Anonymous, 2002), kül miktarı AOAC 945.46'ya göre (Anonymous, 2000), yağ oranı TS 2446'ya uygun olarak Gerber yöntemiyle (Anonymous, 2015), titrasyon asitliği TS 1018'e göre % laktik asit cinsinden (Anonymous, 2002) ve toplam azot miktarı TS EN ISO 8968-3'e uygun olarak (Anonymous, 2008) Kjeldahl yöntemiyle belirlenmiştir. Toplam azot miktarı, 6.38 faktörüyle çarpılarak protein oranı hesaplanmıştır. Örneklerin pH değerleri için 28 °C sıcaklıkta İnolab WTW (Weilheim, Almanya) marka dijital pH metre kullanılmış ve doğrudan ölçüm yapılmıştır.

Duyusal analiz

Kontrollü şartlarda geleneksel üretimi gerçekleştirilen tuzlu dartı örneklerinde ürünü tanıyan ve tanımayan tüketicilerle ayrı olarak duyusal analiz yapılmıştır. Duyusal analiz öncesi panelist grupları bilgilendirilmiş, geleneksel ürün örnekleri tüketicilere ısıtılarak 32-35 °C sıcaklık aralığında tuzsuz ekmek ve su ile birlikte sunulmuştur.

Geleneksel ürünü tanımayan tüketicilerin kabul edilebilirliğini ölçmek için tüketici testi yapılmıştır. Ürünü tanımayan tüketicilere üç kısımdan oluşan bir anket formu uygulanmıştır (Şekil 1). İlk kısımda cinsiyet, yaş ve eğitim gibi demografik özellikleri belirlemeye yönelik üç ifadeden oluşan bir soru grubu ve ikinci kısımda gıdada yenilik korkusu (neofobi) düzeylerini ölçmeyi amaçlayan bir anket uygulanmıştır. Ürünü ilk kez tadacak kişilerden gıda neofobisi olanların geleneksel ürüne karşı kabul etmeme veya sakınma eğilimi gösterebilecekleri ve bu durumun tüketici testine etki edebileceği düşünüldüğü için Gıdada Yenilik Korkusu Ölçeği uygulanmıştır. Bu kapsamda kullanılan Gıdada Yenilik Korkusu Ölçeği, Pliner ve Hobden'in (1992) hazırlamış olduğu çalışmadan edinilmiş ve geleneksel ürünü tanımayan tüketicilerin yeni gıdaları deneme isteği öngörülmeyle çalışılmıştır. Gıdada Yenilik

Korkusu Ölçeği'nde gıda ve gıda tüketimiyle ilgili durumlar hakkında beş neofilik ve beş neofobik ifadeden oluşan toplam on madde bulunmaktadır. Ölçek 7'li Likert tipi derecelendirmeye sahip olup; "kesinlikle katılmıyorum", "katılmıyorum", "kısmen katılmıyorum", "ne katılıyorum ne katılmıyorum", "kısmen katılıyorum", "katılıyorum" ve "kesinlikle katılıyorum" şeklinde derecelendirilmiştir. Son aşamada ise tüketicilerin geleneksel ürünü görünüş, kıvam/yapı, koku, tat ve genel beğeni özellikleri yönünden 1 ile 5 puanlık hedonik skalada (1: Hiç beğenmedim, 2: Orta derecede beğenmedim, 3: Ne beğendim ne beğenmedim, 4: Orta derecede beğendim, 5: Çok beğendim) değerlendirmeleri ve düşük puan kriterlerini ifade etmeleri istenmiştir. Geleneksel olarak üretilen dartıyı tanımayan 93 kişi çalışmanın örneklemini oluşturmaktadır.

Dartının üretimini bilip tüketen kişilerin de, bu çalışma kapsamında üretilen ürünü görünüş, kıvam/yapı, koku, tat ve genel beğeni özellikleri açısından değerlendirmeleri istenmiştir. Geleneksel olarak ürünü üreten ve tanıyan 10'u kadın ve 4'ü erkek toplam 14 kişiye ulaşılmıştır.

İstatistiksel analiz

Fiziksel, kimyasal ve duyusal analizler ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 22.0 (IBM, 2013) istatistiksel paket programı kullanılarak yapılmıştır. Tuzlu ve tuzsuz dartı örneklerinin analiz sonuçlarının karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Duyusal analiz sonuçlarında gıda neofobisi olan ve gıda neofobisi olmayan tüketicilerin duyusal analizlerine ilişkin karşılaştırmalar t-testi ile yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Dartının üretim yöntemi

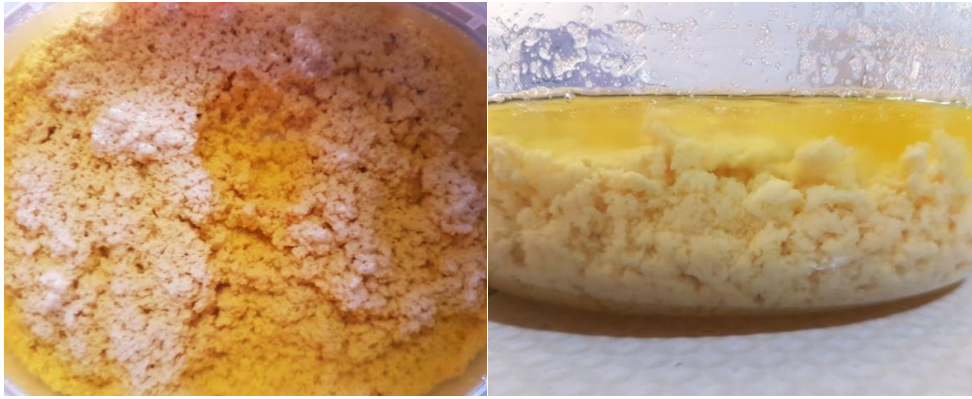
Geleneksel olarak dartı üretiminde çiğ süt kreması ve tuz kullanılır. Çiğ inek sütünden toplanan süt kreması düşük ateşte sürekli karıştırılarak ısıtılma maruz bırakılır. Bu ısıtılma sırasında, krema öncelikle kaynama noktasına (100-101°C) erişir ve kaynarak koyulaşır. Kaynama aşamasında yaklaşık 2.4 kg süt kremasına 6.5 g tuz (1 tatlı kaşığı) ilave edilir. Kaynama devam ederken bir süre sonra yapıdan yağ ayrılmaya

başladığı gözlenir, sonrasında karışım içerisindeki süt bileşenleri süt yağından iyice ayrılarak daha koyu ve heterojen bir kıvama dönüşür. Ürün 107-111°C sıcaklık aralığında pişirilmeye devam edilir. Isıl işlem yağ içerisindeki koyu kısım kavrularak hafif sarıdan kahverengiye dönen renge ve gözenekli bir yapıya dönüşene kadar devam eder. 2.4 kg kremadan yapılan dartı için ısıl işlem süresi yaklaşık 100-135 dakikadır. Isıl işlem sonrasında ürün ocaktan direkt soğuk bir zemine alınarak,

sıcak yağın içerisindeki tortu kısmın daha fazla kavrulması engellenir. Elde edilen ürün (Şekil 2) saklama kaplarına alınarak oda sıcaklığına gelinceye kadar soğumaya bırakılır. Geleneksel ürün soğuduğunda ürün kısmen donmuş olup; süt yağı üstte, tortu kısım altta kalan heterojen bir yapıya dönüşür. Ürün buzdolabı koşullarında saklanır. Geleneksel ürünün tüketilmesi için tekrar ısıtılması gerekir, soğuk tüketilemez.

Adı Soyadı:		Tarih:					
Cinsiyetiniz: Kadın () Erkek ()							
Yaşınız:							
Eğitim Durumunuz:							
<ol style="list-style-type: none"> 1. İlkokul-ortaokul mezunu 2. Lise mezunu 3. Üniversite mezunu 4. Lisansüstü (yüksek lisans / doktora / uzmanlık) 							
1. GIDALARDA YENİLİK KORKUSU ÖLÇEĞİ							
Lütfen gıda neofobi hakkında aşağıda verilen ifadeleri okuyup bu ifadelerle ilgili cevap kağıdında belirtilen tanımlamalardan uygun olanın (yalnızca bir seçeneğin) altındaki parantez arasına (X) işareti koyunuz.							
	Kesinlikle katılmıyorum	Katılmıyorum	Kısmen katılmıyorum	Ne katılmıyorum ne katılmıyorum	Kısmen katılmıyorum	Katılmıyorum	Kesinlikle katılmıyorum
1.Sürekli olarak yeni ve farklı gıdaları denerim.	()	()	()	()	()	()	()
2.Yeni gıdalara güvenmem.	()	()	()	()	()	()	()
3.İçinde ne olduğunu bilmediğim gıdayı denemem.	()	()	()	()	()	()	()
4.Farklı kültür ve bölgelerin gıdalarını beğenirim.	()	()	()	()	()	()	()
5.Farklı kültür ve bölgelerin gıdaları yemek için fazla tuhaf görünüyor.	()	()	()	()	()	()	()
6.Sosyal etkinliklerde yeni gıdalar denerim.	()	()	()	()	()	()	()
7.Daha önce yemediğim gıdaları yemekten korkarım.	()	()	()	()	()	()	()
8.Yediğim gıdalar konusunda çok seçiciyimdir.	()	()	()	()	()	()	()
9.Yemek seçmem, neredeyse her şeyi yerim.	()	()	()	()	()	()	()
10. Farklı kültür ve bölgelerin yiyecek ve içeceklerini sunan restoranlarda yeni tatlar denemeyi severim.	()	()	()	()	()	()	()
2. DUYUSAL DEĞERLENDİRME FORMU							
Size verilen geleneksel bir ürün olan dartıyı aşağıdaki kriterlere göre 5 puan üzerinden değerlendiriniz. 5'ten düşük puan verdiyseniz puan düşürücü kriterinizi yazınız.							
Değerlendirilen Özellikler				Puan (1-5)			
Görünüş							
Kıvam ve Yapı							
Koku							
Tat							
Genel Beğeni							
Puan değerleri ile ilgili açıklamalar	5. Çok beğendim	4. Orta derecede beğendim	3. Ne beğendim ne beğenmedim	2. Orta derecede beğenmedim	1. Hiç beğenmedim		
Yorumlar:							

Şekil 1. Geleneksel gıdanın değerlendirilmesinde kullanılan örnek form.
Figure 1. Sample form used in the evaluation of traditional food.



Şekil 2. Heterojen yapıdaki geleneksel dartı örneği.
Figure 2. Example of a traditional dartı in a heterogeneous structure.

Bileşim analizleri

Ürün üretiminde kullanılan ağırlıkça %24.5 yağ içeren çiğ inek sütü kreması; ortalama %2.79 protein, %29.91 kuru madde, %0.57 kül içermekte olup; titrasyon asitliği %0.60 ve pH'sı 4.50'dir. Smiddy vd. (2009) %25 yağ içeren kremada %31.5 kurumadde, %2.5 protein ve %0.5 kül belirlemiş olup, bu konsantrasyonların artan yağ içeriği ile azaldığını belirtmişlerdir.

Kontrollü şartlarda ve üç farklı zamanda geleneksel üretilen tuzsuz ve tuzlu dartı örneklerinde yapılan analiz sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Yapılan çalışma kapsamında dartının

kurumadde içeriği tuzsuz örneklerde %83.05-%92.13, tuzlu örneklerde %84.13-%87.38 aralığında tespit edilmiştir. Piyasada satışa sunulan kaymak örneklerinde kuru madde miktarını Öksüz vd. (2000) %63.50-%74.00 olarak belirlemişken, Akalın vd. (2006) %67.80-%77.55 olarak belirlemiştir. Kocaoğlu (2009) ise farklı mevsimlerde toplanan endüstriyel kaymak örneklerinde kuru madde miktarının %52.63-%72.11 arasında değiştiği belirtmiştir. Ürünün kuru madde miktarının piyasada satışa sunulan kaymakların kuru madde miktarından yüksek olması, geleneksel ürüne uygulanan ısıl işlemten kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 1. Tuzsuz ve tuzlu dartı örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri.¹

Table 1. Chemical and physical properties of unsalted and salted dartı samples.¹

Örnek Sample	Kurumadde (%) Dry Matter	Protein (%) Protein	Yağ (%) Fat	Kül (%) Ash	Titrasyon Asitliği (%) Titration Acidity	pH
Tuzsuz Geleneksel Üretim Unsalted Traditional Production	87.33±4.56 ^a	8.96±0.43 ^a	68.33±2.08 ^a	1.94±0.05 ^b	1.35±0.04 ^a	4.47±0.21 ^a
Tuzlu Geleneksel Üretim Salted Traditional Production	85.93±1.65 ^a	8.61±0.32 ^a	66.33±3.51 ^a	2.66±0.07 ^a	1.05±0.36 ^a	4.34±0.19 ^a

¹: Ortalama ± standart sapma.

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalama değerler birbirinden farklıdır ($P \leq 0.05$).

¹: Mean ± standard deviation.

^{a,b}: The mean values shown in different letters in the same column are different ($P \leq 0.05$).

Tuz eklenen ve eklenmeyen dartı örneklerinde kül miktarı değerleri karşılaştırıldığında farklılık önemli düzeyde bulunmuştur ($P \leq 0.05$). Tuzsuz

dartı örneklerinde kül oranı ortalama %1.94 iken; tuzlu dartı örneklerinde kül oranı ortalama %2.66 ile daha yüksektir. Eklenen tuz miktarının kül

oranına etki ettiği düşünülmektedir. Tuzlu dartı örneklerinde protein oranları %8.29 ve %8.92 arasında değişirken, tuzsuz dartı örneklerinde protein oranlarının %8.53-%9.39 arasında değiştiği görülmektedir. Piyasada satışa sunulan kaymakların protein değerlerindeki farklılıkların kuru madde miktarına bağlı olduğu bildirilmiş olup (Pamuk, 2017), dartıda da protein miktarındaki farklılıkların benzer şekilde değişen kuru madde miktarıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Tuzlu dartı örneklerinde yağ oranları %66 ve %70 arasında değişirken, tuzsuz dartı örneklerinde yağ oranlarının %63 ve %70 arasında değiştiği görülmektedir. Türk Gıda Kodeksi Krema ve Kaymak Tebliği (Anonymous, 2003) kapsamında piyasada satışa sunulan kaymakta kütlece en az %60 oranında süt yağı bulunması gerekmektedir. Temelde süt kremasından yapılan dartı tebliğ kapsamında satışa sunulmasa da, yağ içeriği bu alt sınır değerinden yüksektir. Geleneksel olarak üretilen dartı piyasada satışa sunulan kaymaklarla eş değer yağ oranına sahiptir. Bu durum heterojen yapıya sahip olan kütlece 100 g dartı örneğinde, 63-70 g yağ ve ortalama 13.4 g su emülsiyonu içerisinde yaklaşık 16.6-23.6 g yağ ve su dışı bileşenlerin olduğunu göstermektedir.

Dartı örneklerinin pH ve % laktik asit cinsinden titrasyon asitliği değerlerinin sırasıyla tuzsuz örneklerde 4.31-4.71 ve %1.31-%1.38 aralığındayken; tuzlu örneklerde 4.19-4.56 ve %0.80-%1.46 aralığında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, tuz eklemenin ürünün pH değeri ve titrasyon asitliği bulgularına etkisinin önemsiz olduğu belirlenmiştir ($P > 0.05$). Piyasada satışa sunulan kaymaklarla ilgili yapılan çalışmalarda Akalın vd. (2006) örneklerinin pH değerlerinin 6.20-7.20 arasında değiştiğini, Kocaoğlu (2009) örneklerinin pH değerlerinin 6.08-7.63 arasında değiştiğini, Dereli ve Şevik (2011) örneklerinin pH değerlerinin 5.12-6.95 arasında değiştiğini saptamıştır. Kaymak örneklerinde laktik asit cinsinden titrasyon asitliği, Kocaoğlu (2009) tarafından incelenen örneklerde %0.43-%0.27 arasında değişirken; Öksüz vd. (2000) tarafından

incelenen örneklerde %0.17-%0.58 arasında değiştiği belirlenmiştir. Geleneksel ürün ısı işlem görmüş krema olup pH değerinin kaymak örneklerine göre düşük olduğu ve titrasyon asitliğinin de daha yüksek olduğu görülmektedir. Üründe asitliğin yüksek olması üretimde kullanılan ve toplanan çiğ süt kremasına sütün sağılması, yağın toplanması ve bekletme koşullarında bulaşan çeşitli mikroorganizmaların faaliyet göstermesinden ve/veya geleneksel üretim tekniklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Buzdolabı koşullarında muhafaza edilen kaymak örneklerinde asitlik derecesinin üçüncü günden itibaren arttığı, ancak -5 ile 0°C arasındaki sıcaklıklarda asitliğin sabit kaldığı belirtilmiştir (Pamuk, 2017).

Duyusal değerlendirme

Duyusal değerlendirmenin ilk kısmında; üretilen ve analizleri gerçekleştirilen geleneksel dartının, ürünü tanıyan tüketiciler tarafından kabul edilen duyusal özelliklere sahip olup olmadığının analiz edilmesi ve tüketicilerin genel beğenisinin ortaya konulması amacıyla tuzlu üretilen dartı örneklerine duyusal analiz yapılmıştır.

Ürünü tanıyan ve üretimini yapan 14 tüketicinin geleneksel ürünle ilgili duyusal analiz bulguları ve ortalama değerleri Çizelge 2'de yer almaktadır. Ürünü tanıyan tüketiciler kokuya tam (5) puan verirken, ikinci olarak tadına ortalama 4.93 ile en yüksek puanı vermişlerdir. Ürünü tanıyan tüketicilerden bir tanesi kendi ürettikleri dartı tadının daha az ekşimsi olduğunu ifade etmiştir. Dartının görünüşü, ürünün tanıyan tüketici grubu tarafından 4.57 ile en düşük puan verilen özellik olmuştur. Dartıyı tanıyan üç tüketici üretim sırasında uygulanan ısı işlem koşullarından dolayı, ürün renginin biraz daha kahverengiye dönebileceğini ve dağınık yapı içerisindeki tortunun çok daha pütürlü görüntüde olabileceğini ifade etmişlerdir. Ürün genel olarak heterojen yapıda olduğu için görünüş, kıvam ve yapısıyla ilgili duyusal değerlendirmede zorlanılmaktadır. Tüketiciler genel olarak kendilerine sunulan dartı örneklerinin gereken özellikleri taşıdığını ifade etmişlerdir.

Çizelge 2. Geleneksel ürünü tanıyan ve tanımayan (gıda neofobisi olan ve olmayan) panelistlerin duyusal analiz değerleri.¹Table 2. Sensory analysis values of panelists who know and do not know (with and without food neophobia) the traditional food.¹

Özellikler Properties	Ürünü Tanıyan Panelistler Tarafından Verilen Puanlar Points Given by Panelists Who Know the Product	Ürünü Tanımayan Panelistler Tarafından Verilen Puanlar Points Given by Panelists Who do not Know the Product		
		Gıda Neofobisi Olmayan Panelistler Tarafından Verilen Puanlar ² Points Given by Panelists without Food Neophobia ²	Gıda Neofobisi Olan Panelistler Tarafından Verilen Puanlar ² Points Given by Panelists with Food Neophobia ²	Ürünü Tanımayan Panelistler Tarafından Verilen Puanlar Points Given by Panelists Who do not Know the Product
Görünüş Appearance	4.57±0.51	3.23±1.06	3.61±1.02	3.40±1.05
Kıvam ve Yapı Consistency and Texture	4.71±0.47	4.00±0.77	3.92±0.96	3.97±0.85
Koku Odor	5.00±0.00	3.82±1.13	3.97 ±1.27	3.89±1.19
Tat Taste	4.93±0.27	4.25±1.06	3.97±1.15	4.12±1.10
Genel Beğeni Overall Acceptability	4.86±0.36	4.02±0.96	3.87±0.98	3.96±0.97

¹: Ortalama ± standart sapma.²: Gıda neofobisi olan ve olmayan panelistler arasındaki farklılıklar önemli değildir ($P > 0.05$).¹: Mean ± standard deviation.²: The differences between food neophobia and food non-neophobic are not important ($P > 0.05$).

Duyusal değerlendirmenin ikinci kısmında ise ürünü tanımayan 93 tüketicinin katılımıyla geleneksel ürünün duyusal analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2). Geleneksel ürünü tanımayan ve duyusal analize katılan katılımcılardan %48.4'ü kadınlardan, %51.6'sı erkeklerden oluşmaktadır. Katılımcıların %54.8'i 20-29 yaş aralığında, %22.6'sı 30-39 yaş aralığında, %14.0'ü 40-49 yaş aralığında ve %8.6'sı 50 yaş ve üzeridir. Yine katılımcıların %38.7'sinin üniversite mezunu olduğu, %37.6'sının lise mezunu olduğu, %19.4'ünün lisansüstü eğitim aldığı ve %4.3'ünün ilköğretim mezunu olduğu tespit edilmiştir.

Geleneksel olarak üretilen dartı, ürünü tanımayan tüketiciler tarafından gıda neofobisi olanlar ve olmayanlar diye iki grup altında değerlendirilmiştir. Tüketicilerden 41'inin gıda neofobisi olduğu ve 52'sinin gıda neofobisi olmadığı saptanmıştır. Ürünü ilk kez tadacak kişilerden gıda neofobisi olanların dartıya karşı

kabul etmeme veya sakınma eğilimi gösterebilecekleri ve bu durumun tüketici testine etki edebileceği düşünülmüştür. Ancak görünüş, kıvam/yapı, koku, tat, genel beğeni özelliklerini kapsayan duyusal analizde gıda neofobisi olan ve olmayan tüketici grubu arasında istatistiksel anlamlı bir fark ($P > 0.05$) bulunmamıştır. Geleneksel ürün tüketiciler tarafından her ne kadar ilk kez deneyimlenmiş olsa da, yabancı olmadıkları bir mutfağın ürünü olduğu için tüketicilerin gıda neofobisinin olup olmasının duyusal analiz sonuçlarına etki etmediği düşünülmektedir. Onurlubaş ve Taşdan (2017) geleneksel ürünlerin tüketiminde aile büyüklerinin geleneksel gıda tüketim alışkanlıklarının, geleneksel gıdaların besleyici ve sağlıklı olması algısının ve merak etmenin etkili olduğunu saptanmış olup; Türkiye genelinde geleneksel gıda tüketme olasılığını yaklaşık %98.0 olarak tespit etmiştir.

Duyusal analiz sonuçlarına göre geleneksel dartı örnekleri genel özellikleri açısından ürünü tanımayan tüketicinin beğenisini kazanmıştır. Bu panelist grubu tarafından en az beğenilen özellik ortalama 3.40 puan ile görünüş olmuş ve geleneksel ürünün heterojen, yağlı ve farklı görüntüsü olduğu ifade edilmiştir. Bir tüketici, yağ içerisindeki heterojen görüntüden dolayı tahine benzetmiş ve bunu tahinde olduğu gibi bir kusur olarak algıladığını ifade etmiştir. Dartının kıvam olarak dağınık ve yağlı olması sebebiyle ürün ekmeyle alınırken veya ekmeğin üzerine koyulurken çekinceler yarattığı da ayrı bir görüş olarak ifade edilmiştir. Geleneksel ürünün kendine has kokusu ortalama 3.89 ile görünüşten sonra en düşük puanı alan duyusal özellik olmuştur. Ürünü tanımayan tüketicilerden bir bölümü gıdanın kokusunu ağır bulduklarını ifade etmişlerdir.

Dartı genel olarak görüntü ve koku açısından ortalama düzeyde puan alsa da; ürünü tanımayan tüketiciler tarafından tadı sevilmiş ve tat açısından ortalama 4.12 ile en yüksek puanı almıştır. Ekşimsi diye nitelendirilen tat geleneksel ürünü tanımayan tüketicilerin %17.2'si tarafından içerisinde kavrulmuş süt parçaları sebebiyle kızarmış peynire veya kuymağa benzetilmiştir. Süt yağı, süt ürünlerinin fiziksel özellikleri, besin değerleri, tat ve aromaları üzerinde önemli rol oynamaktadır (Metin, 2012). Geleneksel dartının tat bakımından yüksek puan alması ve tercih nedeni olması süt yağı yönünden yoğun bir ürün olması, süt yağından ileri gelen duyusal özellikler ve yağ dışında az miktardaki süt kısmının kavrulması ile oluşan aroma ile açıklanabilmektedir.

SONUÇ

Geleneksel ürünlerden biri olan dartının üretimini, bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin ortaya koyulduğu bu çalışmayla, geleneksel ürünün kalitesini kaybetmeden üretilmesi, üretime standart kazandırılması ve coğrafi işaretleme yapılabilmesi için bir kaynak teşkil edeceği düşünülmektedir. Dartı geleneksel bir ürün olduğu için ürünü tanıyan ve tanımayan tüketicilerden duyusal niteliklere ilişkin değerlendirme yapmaları istenmiştir. Geleneksel ürünün duyusal analiziyle ilgili olarak daha ayrıntılı

çalışmaların yapılmasına; özellikle duyusal değerlendirme kartlarının oluşturulmasına, ürüne özgü karakteristiklerin ortaya konulmasına ve üründe karşılaşılabilecek kusurlar hakkında daha fazla çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca endüstriyel üretim için üretim yönteminin standardize edilmesi, gıda güvenliği, raf ömrü ve ambalajlama çalışmalarına yönelik araştırmalara odaklanılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından "2016-02.BŞEÜ.10-03" proje numarası ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

Akalın, A.S., Gönc, S., Ünal, G., Ökten, S. (2006). Determination of some chemical and microbiological characteristics of kaymak. *Grasas Aceites*, 57(4): 429-432, doi: 10.3989/gya.2006.v57.i4.70.

Alyakut, Ö., Üzümcü T.P. (2017). Gastronomi turizmi bağlamında Kandıra beslenme kültürü ve unutulmaya yüz tutmuş lezzetleri Goncaaydın köyü örneği. IV. Uluslararası Çoban Mustafa Paşa ve Kocaeli Tarihi-Kültürü Sempozyumu, 24-26 Mart 2017, Kocaeli, Türkiye.

Anonymous (2000). Ash of milk – gravimetric method, Official Methods of Analysis of AOAC International Method 945.46, (33.2.10).

Anonymous (2002). TSE İnek sütü - çiğ standardı (TS 1018), Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonymous (2003). Türk gıda kodeksi. Krema ve kaymak tebliği (2003 /34). Tarım ve Köyşleri Bakanlığı. 27 Eylül 2003 tarih ve 25242 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2008). TSE Süt - azot içeriği tayini (TSE EN ISO 8968-3), Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Anonymous (2009). Adapazarı dartılı keşkek, Tescil No: 168. <http://www.turkpatent.gov.tr/TURKPATENT/resources/temp/A5D196BF-0F97-4330-864A-1BC294CF484F.pdf> (Erişim tarihi:11.05.2018).

- Anonymous (2015). T.S.E., Süt-yağ muhtevası tayini- gerber metodu (Rutin metod) (TS ISO 2446), Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- Anonymous (2017). Akçakoca melengüçceği tatlısı, Tescil No: 279. <http://www.turkpatent.gov.tr/TURKPATENT/resources/temp/E6FAF650-8BB8-4866-90F9-D3A186A9652B.pdf> (Erişim tarihi:11.05.2018).
- Belc, N., Duta, D.E., Iorga, E., Mohan, G., Moşoiu, C.E., Vasile, A., Sanmartin, A., Pedrero Torres, M., Martinez, D.Q., Amaro, A., Teixeira, P., Cardos, E., Pintado, M., Ferreira, V., Magalhães, R., Almeida, G. (2016). Food safety aspects concerning traditional foods. In: *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, Barbosa-Cánovas, G.V. (chief ed.) Switzerland: Springer International Publishing, pp. 33-54. ISBN: 978-3-319-24040-4.
- Cumhur, Ö. (2017). Geleneksel gıdaların endüstriyel üretime aktarılması. 1. Uluslararası Turizmin Geleceği Kongresi: İnovasyon, Girişimcilik ve Sürdürülebilirlik, 28-30 Eylül 2017, Mersin, Türkiye, 1693 s.
- Cumhur, Ö. (2018). Geleneksel bir lezzet: Dartı, International Gastronomy Tourism Studies Congress, 20-22 September 2018, Kocaeli, Turkey, 887 p.
- Dereli, Z., Şevik, R. (2011). Modifiye atmosferde paketlenerek depolanan afyon kaymağında oluşan kimyasal değişimler. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 6 (2): 1-8.
- IBM Corp. Released (2013). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Kocaoğlu, E. A. (2009). Ankara'da satışa sunulan kaymakların bazı özellikleri üzerine bir araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 47 s.
- Metin, M. (2012). Süt teknolojisi, sütün bileşimi ve işlenmesi. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, No: 33, 6. Baskı, İzmir, Türkiye, 802 s. ISBN: 9754832792.
- Onurlubaş, E., Taşdan, K. (2017). Geleneksel ürün tüketimini etkileyen faktörler üzerine bir araştırma. *Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 12: 115-132, doi: 10.11616/AbantSbe.
- Öksüz, Ö., Kurultay, S., Simsek, O., Gündoğdu, A. (2000). Tekirdağ ili merkezinde tüketilen kaymakların bazı kimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu, 22-23 Mayıs 2000, Tekirdağ, Türkiye, 567-570 s.
- Pamuk, Ş. (2017). Geleneksel Afyon kaymağı üretimi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 12(1): 84-89, doi: 10.17094/ataunivbd.309780.
- Pliner, P., Hobden, K. (1992). Development of a scale to measure the trait of food neophobia in humans. *Appetite*, 19: 105-120, doi: 10.1016/0195-6663(92)90014-W.
- Smiddy, M. A., Kelly, A.L., Huppertz, T., (2009). Cream and related products. In: *Dairy fats and related products*, Adnan Y. Tamime (chief ed.), United Kingdom: Wiley-Blackwell, pp. 61-82. ISBN: 978-1-405-15090-3.
- Trichopoulou, A., Soukara, S., Vasilopoulou, E., (2007). Traditional foods: a science and society perspective. *Trends Food Sci Technol*, 18: 420-427, doi: 10.1016/j.tifs.2007.03.007.
- Üzümcü T.P., Alyakut Ö. & Akpulat N.A. (2017). Coğrafi işaretleme kapsamında kocaeli gastronomik ürünlerinin değerlendirilmesi. *KMÜ Sosyal ve Ekonomik Araştırmalar Dergisi*, 19 (28): 132-140.

SEÇİLMİŞ ENDOJEN LAKTİK STARTER KÜLTÜRLER İLE TURŞU ÜRETİMİ

Mehmet Tokatlı^{1*}, Simel Bağder Elmacı², Nurdan Arslankoz İşleyen³, Filiz Özçelik²

¹Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat, Türkiye

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

³Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Yeniçağa Yaşar Çelik Meslek Yüksekokulu, Bolu, Türkiye

Geliş / Received: 24.05.2019; Kabul / Accepted: 01.07.2019; Online baskı / Published online: 26.07.2019

Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. (2019). Seçilmiş endojen laktik starter kültürler ile turşu üretimi. GIDA (2019) 44 (4): 742-757 doi: 10.15237/gida.GD19081

Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. (2019). Pickle production by selected indigenous lactic starter cultures. GIDA (2019) 44 (4): 742-757 doi: 10.15237/gida.GD19081

ÖZ

Bu çalışmada, turşu üretiminde kullanılabilir starter kültürler geliştirmek amacıyla, seçilmiş endojen (yerel) *Lactobacillus plantarum* (MF513, MF377, MF213) ve *L. plantarum* MF513-*Pediococcus ethanolidurans* MF179 karışım suşları starter kültür olarak kullanılmış; fermentasyon süresince ve 6 aylık depolama aşamasında turşuların kimyasal, mikrobiyolojik, duyu özellikleri değerlendirilmiştir. Starter kültürlerin fermentasyon sonuna kadar stabiliteğini koruyup koruyamadıkları, saf kültürlerin fermentasyonun başlangıcı ve bitimindeki hücre protein profilleri (SDS-PAGE) karşılaştırılarak belirlenmiştir. Karışık kültür kullanılarak üretilen turşularda en yüksek asitlik değeri (% 0.87) fermentasyonun 20. gününde ulaşıldığı belirlenmiş ve pH değeri 3.26 olarak ölçülmüştür. Kontrol örneğinde asitlik artışı starter kullanılan turşu örneklerine kıyasla daha yavaş gerçekleşmiştir. *L. plantarum* suşlarının fermentasyon sonuna kadar stabiliteğini korudukları ve ortamdaki baskın mikroorganizmalar oldukları belirlenmiştir. Depolama sonrası en yüksek laktik asit (1.62 g/100 mL) ve en düşük etil alkol (0.26 g/100 mL) miktarı MF513-MF179 suşlarının kullanıldığı turşu örneğinde ölçülmüştür.

Anahtar kelimeler:Turşu, Laktik asit bakterisi, Starter kültür, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus ethanolidurans*

PICKLE PRODUCTION BY SELECTED INDIGENOUS LACTIC STARTER CULTURES

ABSTRACT

In this study, in order to develop starter cultures suitable for pickle production, the selected indigenous cultures of *Lactobacillus plantarum* (MF513, MF377, MF213) and mixed cultures of *L. plantarum* MF513-*Pediococcus ethanolidurans* MF179 were used as starter cultures. The chemical, microbiological and sensory properties of pickles were monitored during fermentation and 6 months of storage. In order to determine whether the starter cultures preserved their stability until the end of fermentation, the cell protein profiles (SDS-PAGE) of pure cultures before fermentation were compared with that of after fermentation. The highest acidity (0.87 %) was found to be reached in the pickles produced by the addition of mixed starter cultures at the 20th day of fermentation and the pH value was measured as 3.26. The acidity increase was slower in control samples as compared with the starter culture-added pickle samples. It was determined that *L. plantarum* strains preserved their stability until the end of fermentation and were predominant microorganisms in the environment. After storage, the highest lactic acid (1.62 g/100 mL) and the lowest ethanol (0.26 g/100 mL) content was observed in the pickle samples inoculated with MF513-MF179 strains.

Keywords:Pickle, lactic acid bacteria, starter culture, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus ethanolidurans*

* Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author;

✉ mehmet.tokatli@gop.edu.tr

☎ + 90 (356) 252 1616 / 2887

☎ + 90 (356) 252 1729

GİRİŞ

Meyve ve sebzelerin laktik asit fermantasyonu ile muhafaza edilmesi çok eski yıllardan bu yana uygulanan, bir gıda koruma yöntemidir. Laktik asit bakterileri (LAB) tarafından gerçekleştirilen laktik asit fermantasyonu sonucu üretilen fermente gıda ürünleri arasında turşu önemli bir yere sahiptir (Tokatlı vd., 2012). Turşu üretiminde kullanılan hıyar, lahana, yeşil biber gibi bitki kökenli substratların doğal mikroflorasında, laktik asit fermantasyonunu gerçekleştiren LAB'nin yanı sıra *Pseudomonas*, *Erwinia* ve *Enterobacter* türlerine ait bozulma yapan aerobik bakteriler, maya ve küfler gibi arzu edilmeyen mikroorganizmalar da yer almaktadır. LAB'nin taze hammaddedeki başlangıç sayıları da diğer mezofilik mikroorganizmalara kıyasla düşüktür (Breidt vd., 2013). Fermente sebzelerde, süt fermantasyonlarında olduğu gibi hammaddedeki istenmeyen endojen mikroflorayı pastörizasyon yolu ile inhibe etmek mümkün olmamaktadır. Ancak, fermantasyonun başlangıcında sayıları oldukça düşük olan LAB, yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek asitlik ve düşük pH (<4.5) ile karakterize edilen turşunun ekstrem koşullarına dayanabildiklerinden, endojen mikroflorayla rekabete girerek ortama hakim olurlar. Bu zorlu ortam koşullarında koliform grubu bakteriler, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* ve LAB dışındaki diğer mikroorganizmalar inhibe olurlar (Hutkins, 2006). Turşu üretiminde LAB'nin ortama hakim olması için su aktivitesi, sıcaklık, anaerobik ortam, tuz konsantrasyonu ve asitlik gibi uygun çevresel koşullar ayarlanırken, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi engellenmiş olur (Erten vd., 2016). Endojen LAB ve diğer mikrobiyel flora çevresel faktörlere bağlı olarak değiştiğinden, sebze fermantasyonlarının kontrolü zordur. Bu nedenle, kontrolsüz koşullarda gerçekleşen spontan fermantasyon son ürünün kalitesi, duyuşal özellikleri, güvenliği ve stabilitesinde farklılıklara yol açabilmektedir (Gardner vd., 2001). Bu bağlamda, turşu üretiminde kullanılacak uygun starter kültürlerin geleneksel turşulardan izole edilen endojen (yerel) LAB arasından seçilmesi, bu endojen suşların, farklı kaynaklardan izole edilen endüstriyel starter kültürlerle kıyasla, turşunun zorlu çevresel koşullarına daha iyi adapte olabilmeleri ve

kolaylıkla floraya hakim olabilmeleri nedeniyle oldukça önemlidir. Bu şekilde, geleneksel fermente ürünün karakteristik duyuşal özelliklerini koruyarak, güvenli ve standart kalitede turşu üretimi mümkün olmaktadır (Tokatlı vd., 2017).

Ülkemizde Ankara-Çubuk bölgesi geleneksel yöntemlerle üretilen turşularıyla ünlüdür. Turşu Türk mutfağının vazgeçilmez ürünlerinden biri olmakla birlikte, üretimi halen küçük ölçekli işletmeler ile sınırlı olup, spontan fermantasyona dayalı olarak üretilmektedir. Büyük üretim potansiyeline rağmen, standart kalitede ürünler elde etmek mümkün olmamaktadır. Ürün standardizasyonu için, seçilen starter kültürlerin standart hammadde ve standart üretim tekniği ile birlikte kullanılması gerekmektedir. Turşu üretimi için uygun starter kültürlerin seçilmesi (Çon ve Karasu, 2009; Karasu vd., 2010) ve turşu üretiminde kullanılması (Çetin, 2011) üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, turşu üretiminde kullanılacak bir starter kültür geliştirmektir. Bu bağlamda, daha önceki çalışmalar ile Ankara Çubuk ilçesinden temin edilen geleneksel turşularından izole edilerek, moleküler tekniklerle tanımlanmış (Bağder Elmacı vd., 2015) endojen LAB arasından teknolojik (Tokatlı vd., 2017) ve fonksiyonel özelliklerine (Tokatlı vd., 2015) göre seçilmiş 4 farklı bakteri kültürü starter olarak kullanılarak pilot ölçekte hıyar turşuları üretilmiş ve depolanmıştır. Üretilen turşular kimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal açıdan incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Starter Kültürler

Çalışmada starter kültür olarak kullanılan endojen *Lactobacillus plantarum* MF513 (erişim no: KJ855887), *L. plantarum* MF377 (erişim no: KJ994374), *L. plantarum* MF213 (erişim no: KJ994430) ve *Pediococcus ethanolidurans* MF179 (erişim no: KJ994445) suşları daha önceki çalışmada Ankara-Çubuk yöresinde üretilen turşulardan izole edilmiş olup, moleküler yöntemlerle tanımlanmış (Bağder Elmacı vd., 2015), teknolojik (Tokatlı vd., 2017) ve fonksiyonel (Tokatlı vd., 2015) özellikleri belirlenmiştir. Ankara Üniversitesi Gıda

Mühendisliği Bölümü Kültür Koleksiyonunda muhafaza edilen suşların 16S rRNA gen dizi analiz sonuçlarına ait GenBank erişim numaraları daha önceki çalışmada belirtilmiştir (Bağder Elmacı vd., 2015).

Turşu Üretimi

Teknolojik ve fonksiyonel özellikleri açısından önemli bulunan LAB suşları (*L. plantarum* MF513, *L. plantarum* MF377, *L. plantarum* MF213 ve *P. ethanolidurans* MF179) starter kültür olarak seçilerek turşu denemelerinde kullanılmıştır. Bu amaçla, Çubuk Bölgesinden temin edilen turşuluk hıyarlar kullanılmıştır. Fermantasyon denemeleri, kapağı açılmadan örnek almaya olanak sağlayan, özel örnek alma düzeneğine sahip 3 L hacimli cam kavanozlarda gerçekleştirilmiştir. Hasadı izleyen 8-10 saat içerisinde laboratuvara getirilen hıyarlar, öncelikle şebeke suyu ile yıkanarak toz, çamur gibi kirliliklerinden arındırılmış ve klor çözeltisi içerisinde 15 dakika bekletildikten sonra, steril kaynak suyu ile yıkanarak klor uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan 1.5 kg hıyar, 1.5 kg salamura (% 8 tuz, % 0.4 asetik asit, % 0.4 CaCl₂, % 2 glikoz) ile birlikte 3 L'lik fermantasyon kaplarına doldurulmuştur.

Fermantasyon denemelerinde; *L. plantarum* MF513, *L. plantarum* MF377, *L. plantarum* MF213 ve *L. plantarum* MF513-*P. ethanolidurans* MF179'in karışık kültürü ile % 5 oranında aşılansmış ve kontrol amacıyla bakteri aşılansmamış örnekler olmak üzere 5 farklı turşu örneği, 28 °C'de sıcaklık kontrollü karanlık bir odada 3 tekerrürlü olarak fermantasyona uğratılmıştır. Starter kültür isimleri bu metinde turşu örneğinin ismi olarak kullanılmıştır. 20 günlük fermantasyon süresince ortaya çıkan kimyasal ve mikrobiyolojik değişiklikler izlenmiştir. Fermantasyon bitiminde kimyasal ve mikrobiyolojik analizlere ek olarak, hıyar turşularında duyuusal analiz ve starter kültür stabilite testleri yapılmıştır.

Depolama

Turşu depolama denemeleri de fermantasyon denemeleri ile aynı anda başlatılmış olup, denemeler 1L hacimdeki hermetik kapaklı cam kavanozlarda ve benzer dolom oranına göre hazırlanmış salamura ile gerçekleştirilmiştir.

Depolama süresince 2., 4. ve 6. aylarda alınan örneklerde kimyasal ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır. Ayrıca, depolama sonunda (6. ay) turşu örneklerinde organik asit, şeker dağılımları ve etil alkol miktarları kromatografik (HPLC) olarak belirlenmiştir. Denemeler 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Mikrobiyolojik Analizler

Salamura örneklerinde toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı (TMAB), Plate Count Agar (PCA) besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre, 30 °C'de 48 saat inkübasyon ile; toplam LAB sayımı, yayma kültürel sayım yöntemi kullanılarak De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) Agar besiyerinde 30 °C'de 72 saat inkübasyon ile; toplam maya-küf sayımı Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC) besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre 30 °C'de 96 saat inkübasyon ile; toplam *Enterobacteriaceae* sayımı % 1 oranında glikoz ilave edilmiş Violet Red Bile Agar (VRBA) besiyerinde yayma kültürel sayım yöntemine göre 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon ile yapılmıştır (Gürgün ve Halkman, 1988). İnkübasyonların süresi sonunda canlı hücre sayımı yapılarak, sonuçlar log kob/mL olarak belirtilmiştir.

Kimyasal Analizler

Salamuraların pH değeri, potansiyometrik olarak, pH-metre (Mettler Toledo, S-20K, İsviçre) ile 20 °C'de ölçülmüştür. Salamura örneklerinde titrasyon asitliği 0.01 N NaOH (Merck, Germany) çözeltisiyle fenolftalein indikatörü (% 0.1 g/mL) eşliğinde belirlenerek g laktik asit/100 mL olarak ifade edilmiştir. Tuz miktarı ise, Mohr yöntemi esas alınarak örneklerin 0.1 N AgNO₃ ile potasyum dikromat (% 5 g/mL) indikatörü eşliğinde titrasyonu ile belirlenmiş ve sonuçlar g NaCl/100 mL olarak verilmiştir. Salamura örneklerinde indirgen şeker tayini DNS (3.5-Dinitrosalisilik asit) kullanılarak, Miller yöntemine göre yapılmıştır (Forouchi ve Gunn, 1983).

Depolama denemelerinin sonunda (6. ay) alınan salamura örneklerinde organik asit, şeker dağılımını ve alkol içeriklerini belirlemek amacı ile; salamura örnekleri santrifüj edilmiş ve membran filtreden (Millipore Millex-HV Hydrophilic PVDF) geçirilerek sıvı faz HPLC cihazı için

hazırlanmıştır. Analiz için Shimadzu HPLC, Japan (SCL 10 AVP sistem kontrol ünitesi, RID 10A dedektör, LC 10AD Vp pompa, CTO 10AS Vp kolon fırını, Class Vp software, DGU 14A degazör, ICsep KE-COREGEL 87H3 kolon, ICsep COREGEL 87H guard kit) cihazı kullanılmıştır. Analiz için saf su mobil faz olarak kullanılarak 20 µL örnek enjeksiyonu yapılmıştır. Standart çözeltiler ise glikoz, fruktoz, etanol, asetik asit ve laktik asit ile hazırlanmıştır (Tomlins vd., 1990).

Duyusal analiz

Fermentasyon sonunda hıyar turşularında, 18-20 panelist tarafından görünüş, renk, koku, lezzet, sertlik ve genel beğeni parametreleri esas alınarak ve 1-5 aralığında puanlama kullanılarak duyuşal değerlendirmeleri yapılmıştır (Shinagawa vd., 1997).

Starter kültür stabilite testi

L. plantarum MF513, *L. plantarum* MF377, *L. plantarum* MF213 ve *P. ethanolidurans* MF179 starter kültürleri kullanılarak gerçekleştirilen 3 tekerrürlü fermentasyon denemeleri sonucunda, fermentasyonun bitiminden sonra salamura örneklerinden yayma plak yöntemine göre MRS katı besiyerine ekim yapılmıştır. Katı besiyeri üzerinde oluşan kolonilerden rastgele 20 adet saf kültür seçilerek, bu bakterilerin salamuraya ilave edilen starter kültür olup olmadıkları, hücre protein profilleri (SDS PAGE elektroforez) incelenerek belirlenmiştir. LAB'nin moleküler düzeyde belirlenmesi için, Laemmli (1970) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek ve Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) tekniği kullanılarak toplam hücre protein profilleri ortaya konmuştur. LAB'nin hücre proteinleri, farklı yöntemlerin kombine edilmesiyle izole edilmiştir (Angelis vd., 2001; Swida ve Binek, 2005; Kim ve Adachi, 2007). Elde edilen proteinler, poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan protein bantları jel görüntüleme sisteminde (Gel Logic 200 Imaging System Kodak, USA) görüntülenerek ilgili starter kültürleri ait olup olmadıkları ortaya konmuştur.

İstatistiksel değerlendirme

Tekerrürlü olarak elde edilen analiz sonuçlarının ortalamaları alınarak standart sapmaları ile birlikte

verilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi ve karşılaştırılması Minitab programında (Minitab release 12.1, Minitab inc., 1998) two sample T-test, one-way (ANOVA) ve balanced (ANOVA) analizleri kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kimyasal ve Mikrobiyolojik Değişimler

Toplam titrasyon asitliği ve pH değeri fermentasyonun seyrinin izlenmesi açısından önemli rol oynamaktadırlar. Özellikle homofermantatif LAB tarafından gerçekleştirilen asit üretimi, salamuranın laktik asit cinsinden toplam asitliğini arttırmakta ve turşuda koruyucu görevi üstlenmesini sağlamaktadır. pH değerindeki azalma, asitlik oluşumunun ortaya çıkardığı bir sonuç olarak kendini göstermektedir (Daeschel ve Fleming, 1984).

Fermentasyon süresince kimyasal değişiklikler incelenecek olursa (Çizelge 1), fermentasyonların başlangıcında salamura pH değerleri 3.91-4.11 aralığında ölçülmüştür. Fermentasyonların başlangıcında salamuranın pH değerlerindeki düşüş, starter kültür kullanılmayan kontrol örneğinde daha yavaş bir hızla gerçekleşirken, daha sonra mikrobiyel aktivitedeki artışa bağlı olarak hız kazanmıştır. Starter kültür kullanılan tüm örnekler fermentasyonun 7. gününden itibaren sabit pH değerlerine ulaşmış, daha sonraki günlerde pH'da çok önemli bir değişim gözlenmemiştir. Kontrol örneğindeki pH düşüşü diğer örneklerle kıyasla daha yavaş seyretmiştir. 20 günlük fermentasyon süresince en düşük pH değeri (pH 3.26) karışık starter kültürün kullanıldığı MF513-MF179 nolu örnekte ölçülmüştür. Kontrol ve MF213 nolu turşu örneklerinde ise fermentasyon en yüksek pH değerlerinde tamamlanmıştır ($P > 0.05$).

Turşu üretiminde salamuraların başlangıç pH'sı, salamuradan karbondioksit (CO₂) geçirilerek veya asetik asit eklenerek daha da azaltılabilir. Salamuranın düşük başlangıç pH değerine sahip olması, fermentasyon sırasında oluşan fazla CO₂'nin salınmasına, LAB'nin seçilimine ve düşük pH değerlerine duyarlı enterobakterilerin inhibe edilmesine yardımcı olmaktadır. Laktik asit

fermantasyonlarında toplam asitlikte meydana gelen artışa paralel olarak ortam pH değerlerindeki azalma derecesi, sistemin tamponlama kapasitesi ve fermentasyondaki mikroorganizmalar tarafından yürütülen diğer biyokimyasal aktivitelerden önemli ölçüde etkilenmektedir. Tuzlu fermentasyonları pH 4.5'ten daha yüksek bir değerde tamamlanırsa, ürünlerin mikrobiyolojik açıdan stabilitesi bozulmaktadır. Diğer taraftan, özellikle hıyar turşularında *Pichia* ve *Issatchbenkia* cinsi mayaların, birincil fermentasyon sırasında üretilen laktik asidi katabolize ederek pH'da bir artışa neden olduğu da bilinmektedir (Pérez-Díaz vd., 2013). Kamdee

vd. (2014), hardal bitkisinin doğal ve starter kültür (*Weissella* spp. ve *L. fermentum*) kullanarak gerçekleştirdikleri laktik asit fermentasyonu sonucunda, starter kullanılan örneklerde pH değerini 3.22-3.24 olarak, doğal fermentasyon ile üretilen ürünlerde ise 3.33-4.44 olarak daha yüksek değerlerde bulmuşlardır. Çon ve Karasu (2009), antagonistik starter kültürler ile üretimi gerçekleştirilen turşularda pH değerlerini 3.50-3.94 aralığında ölçmüşlerdir. Fermente salatalık gibi benzer sebzeler hakkında literatürde bildirilen pH değerleri 3.1-3.5 aralığında olup, sonuçlar ile uyum içerisinde (Montet vd., 2014).

Çizelge 1. Fermentasyon sürüsünce salamura örneklerinin pH, asitlik, tuz ve indirgen şeker miktarları
Table 1. The pH, acidity, salt and reducing sugar in brine samples during fermentation

		Turşu örnekleri					
		Günler	kontrol	MF513	MF377	MF213	MF513-MF179
Toplam asitlik (%)	1		0.23 ± 0.00 ^{Ef}	0.29 ± 0.00 ^{Ac}	0.24 ± 0.01 ^{De}	0.27 ± 0.01 ^{Cc}	0.28 ± 0.01 ^{Bf}
	4		0.48 ± 0.00 ^{Cc}	0.63 ± 0.02 ^{Ad}	0.50 ± 0.01 ^{Cd}	0.60 ± 0.02 ^{Bd}	0.61 ± 0.01 ^{ABc}
	7		0.55 ± 0.01 ^{Cd}	0.67 ± 0.01 ^{Ac}	0.61 ± 0.03 ^{Bc}	0.62 ± 0.01 ^{Bcd}	0.67 ± 0.00 ^{Ad}
	11		0.61 ± 0.03 ^{Bc}	0.71 ± 0.04 ^{Abc}	0.70 ± 0.03 ^{Ab}	0.64 ± 0.01 ^{Bc}	0.74 ± 0.02 ^{Ac}
	14		0.64 ± 0.04 ^{Bbc}	0.73 ± 0.04 ^{Aab}	0.76 ± 0.02 ^{Aa}	0.65 ± 0.01 ^{Bbc}	0.76 ± 0.02 ^{Abc}
	17		0.66 ± 0.03 ^{Cab}	0.74 ± 0.04 ^{Bab}	0.78 ± 0.00 ^{ABa}	0.68 ± 0.04 ^{Cb}	0.81 ± 0.04 ^{Ab}
	20		0.69 ± 0.01 ^{Ca}	0.77 ± 0.05 ^{Ba}	0.78 ± 0.00 ^{Ba}	0.73 ± 0.04 ^{BCa}	0.87 ± 0.08 ^{Aa}
pH	1		4.30 ± 0.00 ^{Aa}	3.91 ± 0.02 ^{Da}	4.11 ± 0.04 ^{Ba}	4.01 ± 0.02 ^{Ca}	3.94 ± 0.02 ^{Da}
	4		3.63 ± 0.01 ^{Ab}	3.45 ± 0.03 ^{Bb}	3.59 ± 0.02 ^{Ab}	3.49 ± 0.04 ^{Bb}	3.47 ± 0.01 ^{Bb}
	7		3.53 ± 0.03 ^{Ac}	3.37 ± 0.04 ^{Bc}	3.44 ± 0.04 ^{Bc}	3.42 ± 0.03 ^{Bc}	3.39 ± 0.01 ^{Bbc}
	11		3.48 ± 0.03 ^{Ac}	3.33 ± 0.03 ^{Cc}	3.37 ± 0.04 ^{BCcd}	3.43 ± 0.02 ^{ABc}	3.32 ± 0.01 ^{Cc}
	14		3.46 ± 0.04 ^{Ac}	3.33 ± 0.03 ^{Cc}	3.35 ± 0.03 ^{BCd}	3.41 ± 0.02 ^{ABc}	3.30 ± 0.01 ^{Cc}
	17		3.44 ± 0.03 ^{Ad}	3.33 ± 0.02 ^{Bc}	3.34 ± 0.03 ^{Bd}	3.41 ± 0.02 ^{ABc}	3.26 ± 0.06 ^{Bc}
	20		3.44 ± 0.03 ^{Ad}	3.34 ± 0.02 ^{BCc}	3.34 ± 0.03 ^{Cd}	3.43 ± 0.03 ^{ABc}	3.26 ± 0.06 ^{Cc}
İndirgen şeker (g/L)	1		25.89 ± 0.27 ^{Aa}	24.05 ± 0.24 ^{Ca}	25.73 ± 0.73 ^{Aa}	24.26 ± 0.43 ^{BCa}	25.31 ± 0.39 ^{ABa}
	4		19.41 ± 1.04 ^{Bb}	21.72 ± 0.63 ^{ABab}	23.48 ± 1.70 ^{Aa}	21.12 ± 0.13 ^{ABb}	21.12 ± 0.08 ^{ABb}
	7		14.14 ± 1.48 ^{Ac}	18.39 ± 2.03 ^{Abc}	18.00 ± 2.10 ^{Ab}	18.59 ± 1.97 ^{Ab}	15.09 ± 0.82 ^{Ac}
	11		4.96 ± 0.25 ^{BCd}	16.54 ± 2.25 ^{Ac}	3.10 ± 1.85 ^{Cc}	8.06 ± 1.05 ^{Bc}	3.63 ± 0.45 ^{Cd}
	14		1.85 ± 0.22 ^{Be}	15.17 ± 3.40 ^{Ac}	1.87 ± 1.08 ^{Bc}	2.04 ± 0.73 ^{Bd}	1.39 ± 0.35 ^{Be}
	17		0.99 ± 0.38 ^{Be}	11.39 ± 1.46 ^{Ade}	0.94 ± 0.25 ^{Bc}	1.11 ± 0.34 ^{Bd}	1.07 ± 0.22 ^{Be}
	20		0.79 ± 0.14 ^{Bc}	8.89 ± 0.11 ^{Ac}	0.71 ± 0.16 ^{Bc}	0.89 ± 0.17 ^{Bd}	0.92 ± 0.15 ^{Be}
% Tuz	1		4.42 ± 0.07 ^{Aa}	4.31 ± 0.18 ^{Aa}	4.43 ± 0.15 ^{Aa}	4.37 ± 0.12 ^{Aa}	4.25 ± 0.08 ^{Aa}
	4		4.25 ± 0.04 ^{Ab}	4.25 ± 0.09 ^{Aa}	4.30 ± 0.10 ^{Aa}	4.30 ± 0.06 ^{Aa}	4.23 ± 0.04 ^{Aa}
	7		4.25 ± 0.02 ^{Abc}	4.24 ± 0.05 ^{Aa}	4.25 ± 0.04 ^{Aa}	4.25 ± 0.04 ^{Aa}	4.25 ± 0.06 ^{Aa}
	11		4.25 ± 0.00 ^{Ac}	4.23 ± 0.07 ^{Aa}	4.25 ± 0.00 ^{Aa}	4.25 ± 0.00 ^{Aa}	4.25 ± 0.04 ^{Aa}
	14		4.24 ± 0.04 ^{Ac}	4.24 ± 0.03 ^{Aa}	4.23 ± 0.06 ^{Aa}	4.24 ± 0.03 ^{Aa}	4.23 ± 0.08 ^{Aa}
	17		4.25 ± 0.01 ^{Ac}	4.25 ± 0.00 ^{Aa}	4.25 ± 0.01 ^{Aa}	4.21 ± 0.07 ^{Aa}	4.25 ± 0.00 ^{Aa}
	20		4.25 ± 0.02 ^{Ac}	4.24 ± 0.02 ^{Aa}	4.24 ± 0.00 ^{Aa}	4.25 ± 0.00 ^{Aa}	4.25 ± 0.00 ^{Aa}

*ABC: İstatistiksel olarak aynı satırdaki veriler arasındaki benzerlik ($P < 0.05$)

**abc: İstatistiksel olarak aynı sütündeki veriler arasındaki benzerlik ($P < 0.05$)

Fermantasyon süresince salamura örneklerinin toplam titrasyon asitliklerinde meydana gelen değişimler Çizelge 1'de verilmiştir. Fermantasyonun 1. gününde örneklerin titrasyon asitlikleri, salamuraya ilave edilen asetik asit kaynaklı olarak % 0.23-0.29 arasında bulunmuştur. Starter kültür kullanılmayan kontrol örneğinde asitlik gelişiminin pH değişiminde olduğu gibi daha yavaş gerçekleştiği görülmektedir. Starter kültür kullanılan turşu örnekleri fermantasyonun ilk günlerinde (1-7. gün) kontrol örneğine kıyasla daha hızlı asit oluşturmuşlardır. Ancak MF377 nolu turşu örneğinde fermantasyonun 4. gününe kadar asitlik artışının kontrol örneği ile benzer olduğu görülmektedir. Fermantasyon sırasında en yüksek titrasyon asitliği (% 0.87) değerine karışık kültür kullanılan MF513-MF179 nolu örnekte fermantasyonun 20. gününde ulaşıldığı belirlenmiştir ($P < 0.05$). Asit oluşumu açısından fermantasyon sonunda karışık kültürün kullanıldığı turşularda en yüksek asitlik ve en düşük pH değerine ulaşıldığı gözlenmiştir. Bu durum, *L. plantarum* MF513 ve *P. ethanolidurans* MF179 suşlarının fermantasyon ortamında sinbiyotik çalışmalarının bir sonucu olarak daha verimli asit oluşumuna sebep olması ile ilişkilendirilmiştir. Tekli starter kültür kullanılarak üretilen salamura örneklerinin gerek pH gerekse toplam asitlik sonuçları incelendiğinde, sadece MF513 nolu turşu salamuralarının fermantasyon bitiminde yüksek asitlik değerlerine ulaştığı görülmektedir. Genel olarak turşu fermantasyonlarında *L. plantarum* türlerinin iyi bir asit üretici suş olduğu bilinmektedir (Nilchian vd., 2016). Bu durum, ayrıca daha önce yapmış olduğumuz LAB'nin teknolojik özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmada söz konusu *L. plantarum* MF513 suşunun iyi bir asit üreticisi olduğu sonucu ile de uyum içerisindedir (Tokatlı vd., 2017). Tüm örneklerde fermantasyon sonunda ulaşılan en yüksek titrasyon asitliği değerlerinin yapılan diğer çalışmalara kıyasla biraz düşük düzeylerde kaldığı belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda ise benzer asitlik değerleri elde edilmiştir. Nilchian vd. (2016), hıyar turşusu ile yaptıkları çalışmada, starter kültür olarak *L. plantarum*, *L. bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*

suşlarını kullanarak gerçekleştirdikleri fermantasyonlarda son ürün asitlik değerini % 0.45-0.63 aralığında bulmuşlar ve kontrol örneğine kıyasla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Akpınar-Bayizit vd. (2007), starter kültür olarak *L. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *L. brevis* ve *P. cerevisiae* suşlarını kullanarak ürettikleri havuç turşularında toplam asitlik değerini % 0.89-0.92 olarak, starter kültür kullanılmadan üretilen kontrol turşu örneklerinde ise % 0.77-0.83 olarak bulmuşlardır.

Salamuralarda bulunan indirgen şeker miktarı da, mikrobiyel popülasyonun hızla çoğalmasına paralel şekilde fermantasyonun 1. gününden itibaren hızla azalmıştır (Çizelge 1). 1. gün salamura örneklerinde belirlenen indirgen şeker miktarlarındaki farklılığın ise aynı olgunluk derecesindeki hammaddeye eşit olarak dağılmasından ve her kavanoz içerisindeki ilk 1 gün içerisinde farklı yoğunlukta bir mikrobiyel gelişme ortaya çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir ($P < 0.05$). Fermantasyonun ilk gününde indirgen şeker miktarı 24.05-25.89 g/L aralığında saptanmıştır. Doğal fermantasyon yolu ile üretilen kontrol örneğinin 7. güne kadar indirgen şeker miktarındaki azalma çok hızlı gerçekleşmiş olup, bu durum asit üretim sonuçları ile uyumsuzluk sergilemiştir. Fermantasyonun ilk aşamasında kontrol örneğinin doğal florasında bulunan mikroorganizmalar tarafından kullanılan şekerlerin bir kısmının organik asitler dışında başka ürünlere dönüşümüne işaret etmektedir. Diğer taraftan, *L. plantarum* ve *P. ethanolidurans* suşları kullanılarak fermente edilen örnekte ise asitlik miktarlarındaki artışa paralel olarak indirgen şeker miktarının da hızla azaldığı görülmektedir. Fermantasyonun 11. gününe kadar kontrol, MF513-MF179, MF377, MF213 nolu örneklerde hızlı bir şekilde azalan indirgen şeker miktarı, bu günden sonra mikroorganizmalar tarafından daha yavaş bir hızla tüketilmiştir. Fermantasyon sonunda kontrol, MF377, MF213 ve MF513-MF179 nolu örneklerde düşük miktarda ve benzer (0.71-0.92 g/L) indirgen şeker kaldığı görülmektedir ($P > 0.05$). Fermantasyon sonunda salamuralarda çok düşük seviyede indirgen şeker

belirlenmesi, bu örneklerde fermantasyonun 17 günde tamamlandığını göstermektedir. Fermantasyon sonunda en yüksek indirgen şeker içeriği MF513 nolu turşu örneğinde (8.89 g/L) belirlenmiştir (Çizelge 1). Starter kültürler, fermente olabilir şekerleri, metabolik yola bağlı olarak lezzet bileşenlerinin yanı sıra laktik aside, organik asitlere, CO₂ ve alkole dönüştürmektedirler (Özer ve Yıldırım, 2018). *L. plantarum* suşları genellikle kalan şekerlerle fermantasyonun son aşamasında neredeyse sadece laktik asit üretirler ve çok düşük pH'ları tolere etme yeteneklerine sahiptirler (Breidt vd, 2013). Ancak, MF513 nolu turşu örneğinde fermantasyonda yüksek asitlik verisine rağmen yüksek miktarda şekerin ortamda kalmış olması tam olarak açıklanamamakla birlikte, MF513 nolu turşuda enzimatik aktivite nedeniyle, fermantasyonun sonlarına doğru şekerlerin sebzelere salamura ortamına difüzyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Gardner vd., 2001).

Denge noktasında % 4 NaCl içerecek şekilde hazırlanan salamuralarda tuz konsantrasyonu, fermantasyonun ilk gününde alınan örneklerde % 4.43-4.25 olarak bulunmuştur (Çizelge 1). Kontrol ve MF513 nolu turşu örneklerinde 1. günden sonra, MF377 ve MF213 nolu örneklerde ise 4. günden itibaren tuz içeriği dengeye ulaşmıştır. Sonuç olarak, tüm örneklerin fermantasyon süresince ulaştıkları tuz denge noktası birbirine benzer ($P > 0.05$) olarak bulunmuş ve fermantasyon % 4.25 tuz konsantrasyonunda tamamlanmıştır.

Starter kültürler ile üretimleri gerçekleştirilen turşu örneklerinin fermantasyon süresince mikrobiyolojik özelliklerinde meydana gelen değişimler Şekil 1'de verilmiş olup, incelendiğinde; starter kültür kullanılan MF513, MF377, MF213, MF513-MF179 nolu örneklerde, fermantasyonun ilk gününde yüksek oranda LAB ve toplam mezofil bakteri tespit edilmiş, en yüksek LAB sayısı, sırasıyla MF513, MF513-MF179, MF213, MF377 nolu örneklerde 8.48; 8.09; 8.06; 7.51 log kob/mL olarak bulunmuştur. Kontrol örneğinde ise, toplam LAB sayısı 4.01 log kob/mL olarak bulunmuştur. Benzer şekilde toplam mezofil bakteri sayısı da, sırasıyla MF513,

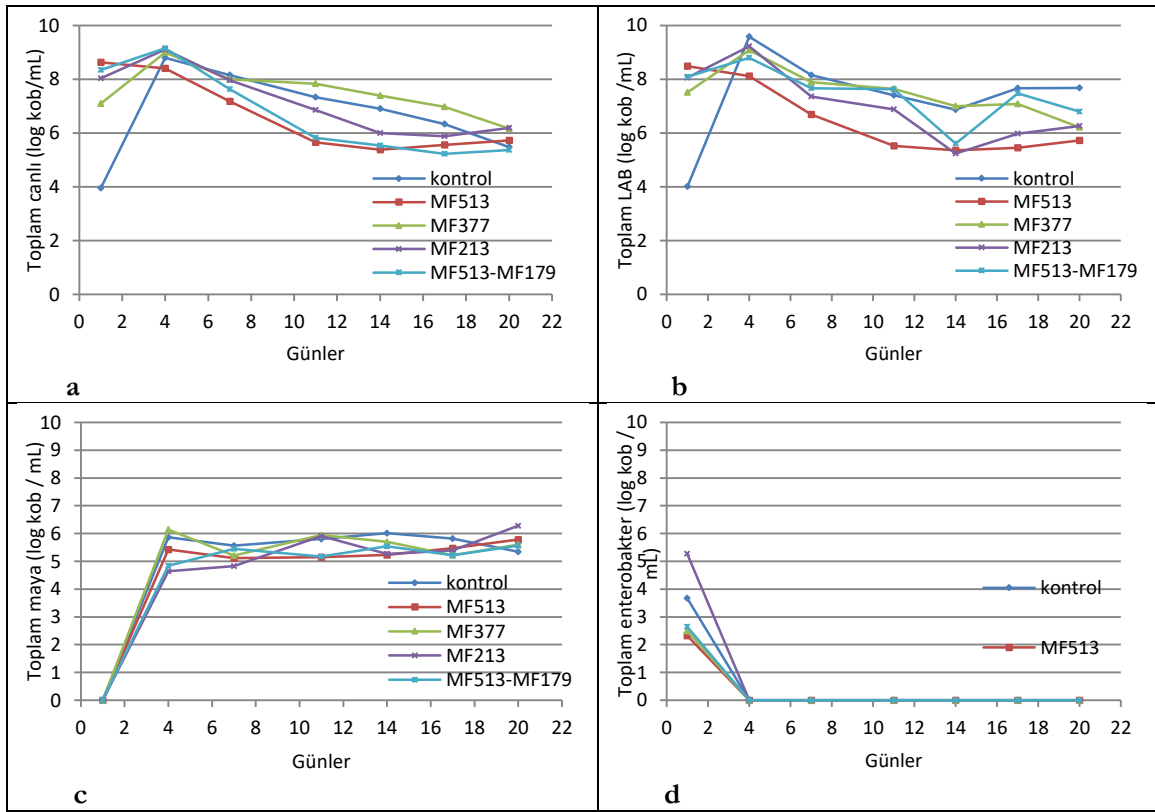
MF513-MF179, MF213, MF377 nolu örneklerde yüksek değerlerde bulunmuştur. Toplam mezofil bakteri sayısı ve toplam LAB sayısı, MF513 nolu örnek hariç tüm örneklerde 4. günde en yüksek değerine ulaşmış, daha sonraki günlerde giderek azalmıştır. Kamdee vd. (2014), starter kültür kullanarak gerçekleştirdikleri fermantasyonlarda başlangıç LAB yükünü 6.11-6.16 log kob/mL, kontrol örneğinde ise 5.58 log kob/mL olarak bulmuşlardır. Fermantasyonun 4. gününden itibaren salamuralarda maya gelişmesi tespit edilmeye başlanmış ve sonraki fermantasyon süresince çok önemli değişimler olmadan fermantasyonu tamamlamışlardır. Nilchian vd. (2016), starter kültür kullanarak ürettikleri hıyar turşularında fermantasyonun 6. gününde toplam LAB, mezofil bakteri ve maya miktarlarını sırası ile 7.46, 6.38 ve 6.65 log kob/mL olarak bildirmişlerdir. Fermente ürünlerde pH değerinin 4.5' in altına düşmesi birçok bozulma yapan bakteriler ve enterobakteriler için gelişmeyi sınırlayıcı faktör olduğu bilinmektedir (Özer ve Yıldırım, 2018). Fermantasyonun 1. günü tüm örneklerde rastlanan enterobakteriler ise 4. günden itibaren sayılamamıştır. Bu durum asitlik gelişimine paralel olarak enterobakterilerin daha fazla gelişemedikleri şeklinde yorumlanmıştır. Kamda vd. (2015) yaptıkları çalışmada, starter olarak LAB karışık kültürleri (*L. plantarum* UFLA CH3, *P. acidilactici* UFLA BFFCX 27.1) kullanılarak üretilen fermente turşularda yüksek miktarda organik asit ve esterlerin üretimi sonucu enterobakter gelişiminin inhibe edildiği sonucuna ulaşmışlardır.

Duyusal Değerlendirme

Çizelge 2 incelendiğinde kontrol ve starter kültürlerin kullanıldığı tüm turşu örneklerinin görünüş ve koku puanları benzer bulunmuştur ($P > 0.05$). Kontrol gurubuna ait renk puanlaması ise starter kullanılan örneklerden daha düşük olarak değerlendirilmiştir ($P < 0.05$). MF213 nolu turşu örneğinin ise lezzet, sertlik ve genel beğeni olarak almış olduğu puanların diğer turşu örneklerine göre daha düşük kaldığı görülmektedir. Bu durum MF213 nolu turşu örneğinde fermantasyon sonuna doğru maya sayısında gözlenen artış ile ilişkilendirilmiş ve artan maya popülasyonunun ürünün lezzet, sertlik ve genel beğeni puanlarına

olumsuz yansıdığı sonucunu göstermektedir. Çoğu turşu fermantasyonlarında maya aktivitesindeki artış, pektolitik enzimler ve uçucu bileşiklerin miktarında artışa sebep olarak ürünlerin fiziksel ve duyu kalitesini olumsuz etkilemektedir (Holzapfel, 2014). Diğer taraftan da bazı çalışmalarda bir miktar maya aktivitesinin ürünün kalitesine olumlu etkisinin bulunduğu belirtilmektedir (Wu vd., 2014). Duyusal değerlendirme sonuçları genel olarak

değerlendirilecek olursa; starter kültür kullanılarak üretilen turşuların beğenilme oranı, starter kültür kullanılmadan doğal fermantasyon ile üretilen kontrol örneklerine kıyasla belirgin bir farklılık ortaya koymamıştır. Xia vd. (2017), *L. brevis* AR123 suşunu starter kültür olarak kullandıkları çalışmada spontan fermantasyon ile elde edilen ürünlere kıyasla duyu açıdan daha iyi ürün elde ettiklerini bildirmişlerdir.



Şekil 1. Fermantasyon süresince salamuraadaki mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/mL) a) Toplam mezofilik aerobik bakteri b) Toplam LAB c) Toplam maya-küf d) Toplam Enterobacteriaceae
Figure 1. Results of microbiological counting in brine during fermentation (log cfu/mL) a) Total mesophilic aerobic bacteria b) Total LAB c) Total yeast-mold d) Total Enterobacteriaceae

Çizelge 2. Fermantasyon sonrası turşuların duyu değerlendirme sonuçları
Table 2. Results of sensory evaluation of pickles after fermentation

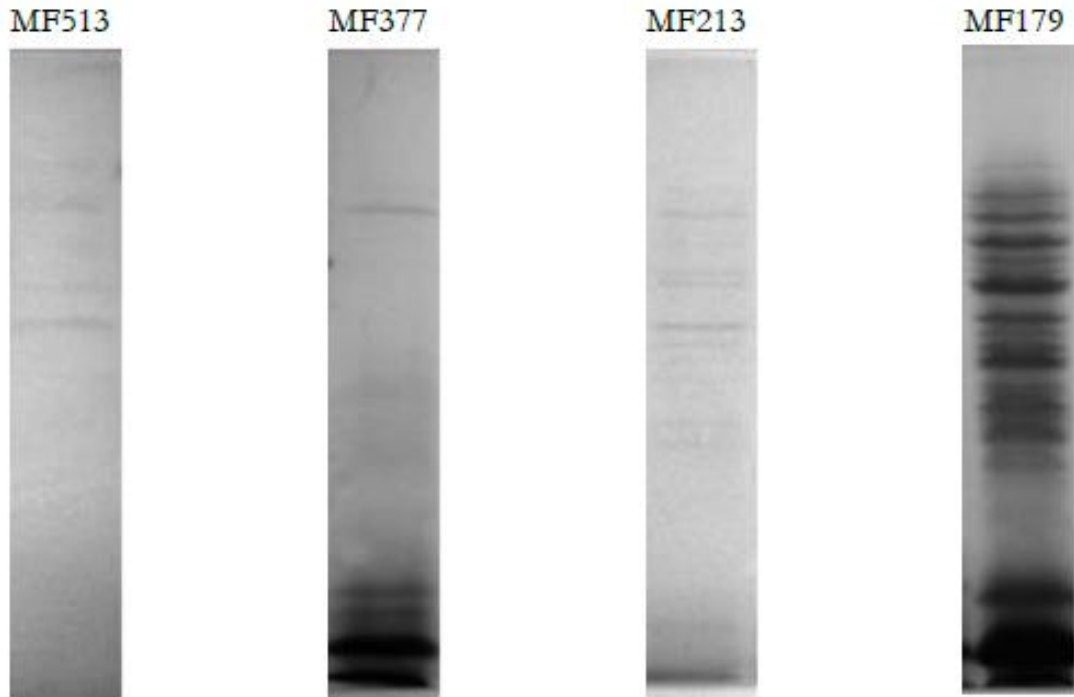
	Görünüş	Renk	Koku	Lezzet	Sertlik	Genel Beğeni
kontrol	4.00 ± 0.20 ^a	3.80 ± 0.08 ^a	3.74 ± 0.21 ^a	3.70 ± 0.31 ^a	4.37 ± 0.47 ^{ab}	3.71 ± 0.29 ^{ab}
MF513	4.00 ± 0.29 ^a	3.78 ± 0.36 ^{ab}	3.53 ± 0.64 ^a	3.56 ± 0.68 ^{ab}	4.35 ± 0.18 ^a	3.61 ± 0.72 ^{ab}
MF377	4.11 ± 0.35 ^a	4.13 ± 0.17 ^b	4.11 ± 0.29 ^a	3.93 ± 0.26 ^a	4.33 ± 0.32 ^{ab}	3.97 ± 0.29 ^a
MF213	3.96 ± 0.10 ^a	3.81 ± 0.20 ^{ab}	3.74 ± 0.10 ^a	3.30 ± 0.03 ^b	4.07 ± 0.06 ^b	3.42 ± 0.08 ^b
MF513-MF179	4.02 ± 0.50 ^a	3.83 ± 0.25 ^{ab}	3.80 ± 0.37 ^a	3.78 ± 0.43 ^a	4.13 ± 0.22 ^{ab}	3.60 ± 0.47 ^{ab}

*abc: İstatistiksel olarak aynı sütundaki veriler arasındaki benzerlik ($P < 0.05$)

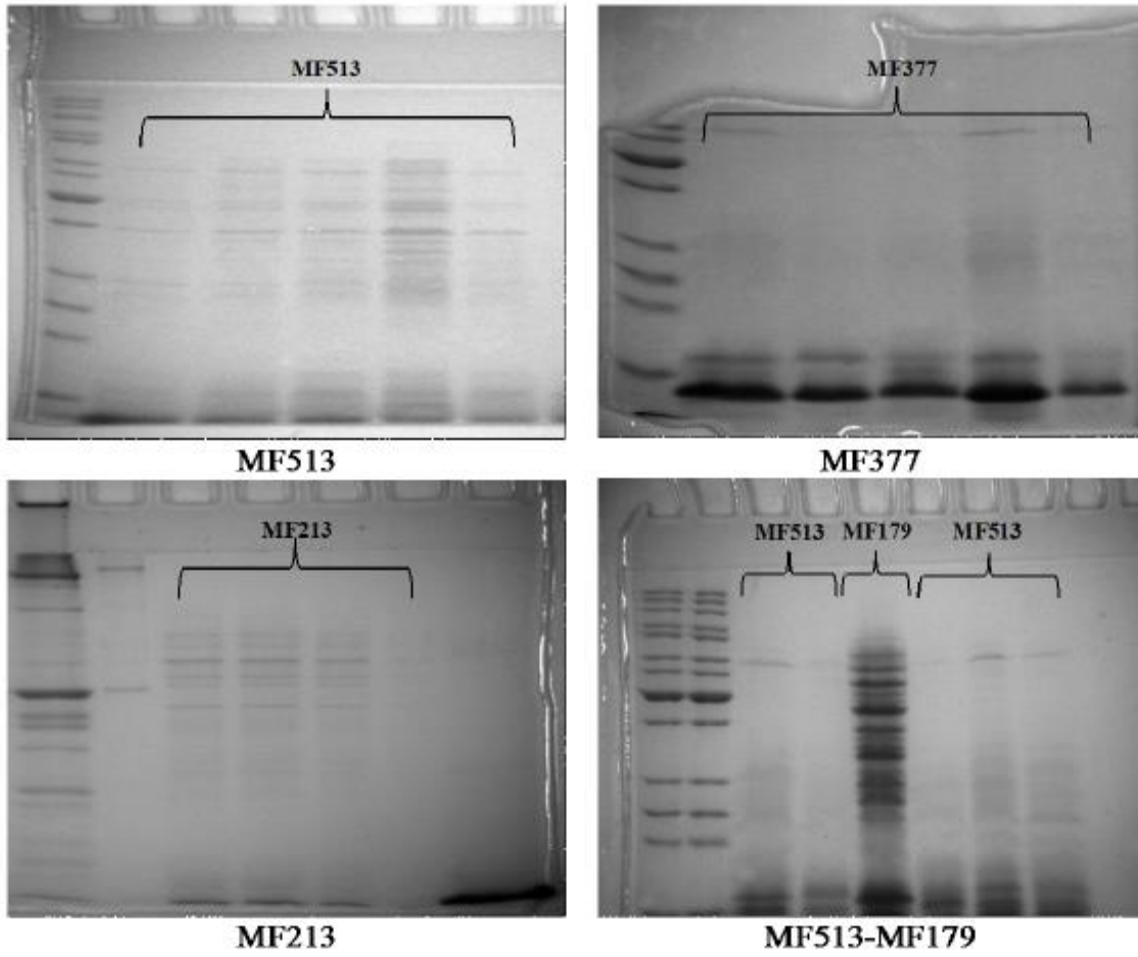
Starter Kültürlerin Stabiliteleri

Turşu örneklerine ilave edilen starter kültürlerine ait hücre protein profilleri (Şekil 2), MF513, MF377 ve MF213 suşları kullanılarak hazırlanan turşu fermantasyonlarının bitiminde izole edilen hücrelerin protein profilleri (Şekil 3) ile uyum içerisindedir. Yapılan çalışmada *L. plantarum* suşlarına ait protein bantlarının daha az sayıda ve silik olduğu görülmektedir. *L. plantarum* suşlarının pH 3.1 ile 3.5 arasında değişen yüksek asit toleransı, bu bakterileri turşu üretimi için starter kültür olarak uygun türler haline getirmektedir (Di Cagno vd., 2013). Bu nedenle, *L. plantarum* genellikle çoğu sebze fermantasyonunun sonunda baskın konumdadır (Mäkimattila vd., 2011). Ancak, MF513-MF179 nolu turşu örneklerinden fermantasyon sonunda, MF179 numaralı starter kültüre ait bakteri protein profiline sahip sadece 3 bakteri izole edilirken, diğer 17 izolatan MF513 numaralı kültüre ait protein profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum, *P. ethanolidurans* MF179 suşunun fermantasyon sonuna kadar stabilitesini çok iyi koruyamadığı sonucunu göstermektedir.

Tokatlı vd. (2017) tarafından bu suşlara ait teknolojik özelliklerin incelendiği çalışmada *P. ethanolidurans* MF179 suşunun yüksek asitlik ve tuz şartlarında MF513 numaralı suşa göre daha zayıf bir gelişme göstermesi bulduğumuz sonucu destekler niteliktedir. Kamdee vd. (2014) bitkisel fermente ürünlerin üretiminde *Weissella* spp. ve *L. fermentum* suşlarını starter kültür olarak kullandıkları çalışmada, ürünlerin fermantasyon süresince starter kültür florasındaki değişimini rep-PCR tekniği ile izlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada farklı inokulasyon oranlarında starter kültür kullanarak üretimini gerçekleştirdikleri ürünlerde fermantasyonun başlangıç aşamalarında *Weissella* spp. türünün predominant florayı oluşturduğunu, ancak daha sonra hızlı bir şekilde 3. günden itibaren floranın *L. fermentum* ve *L. plantarum* lehine değiştiğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde, diğer bazı çalışmalarda da fermantasyon sonunda ürünlerde dominant florayı *L. plantarum* suşlarının oluşturduğu belirtilmektedir (Nguyen vd., 2013).



Şekil 2. Starter kültür olarak kullanılan suşlara ait hücre protein profilleri (SDS-PAGE)
Figure 2. Whole cell protein profiles of LAB strains used as starter culture (SDS-PAGE)



Şekil 3. Starter kültürler ile üretilen turşu örneklerinden izole edilen laktik asit bakterilerine ait hücre protein profilleri (SDS-PAGE)

Figure 3. Whole cell protein profiles of lactic acid bacteria isolated from pickle samples produced by starter cultures (SDS-PAGE)

Depolama

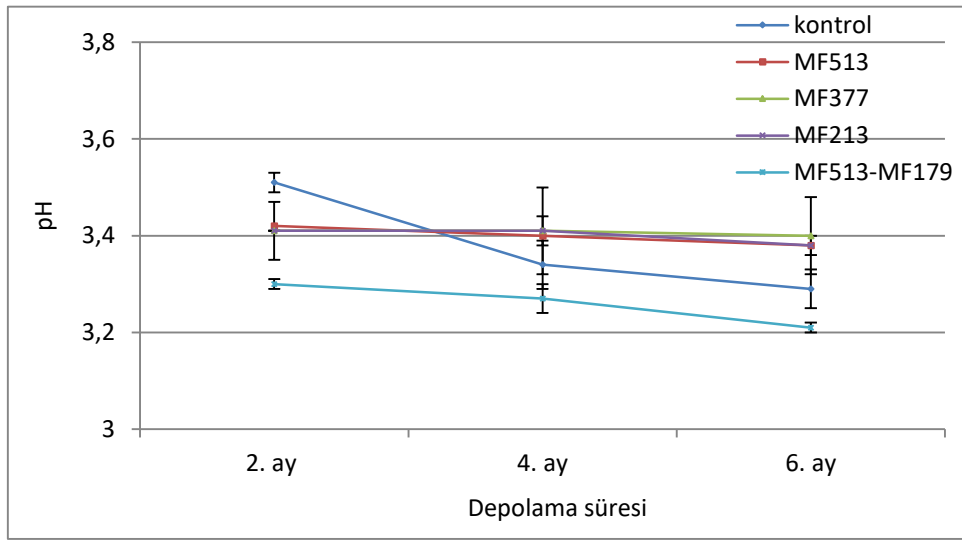
Depolama amacı ile üretimi gerçekleştirilen turşu gruplarından elde edilen veriler ile fermantasyon denemesinde üretilen turşulardan elde edilen veriler arasında bir ilişki veya bağıntı kurulması amaçlanmamış olup, tamamen ayrı bir deneme olarak düşünülmüştür. İki deneme arasındaki benzerlik, yalnızca aynı bileşimdeki salamuraların ve araştırma materyali olarak aynı özellikteki hiyarların kullanılması olarak kalmıştır. Depolama denemesi sırasında elde edilen değerler, farklı salamuralardan ve farklı depolama süreleri sonucu elde edilen kimyasal analizlerin ortalama deneysel sonuçları, Şekil 4' te verilmiştir.

Gerçekleştirilen depolama denemelerine ait pH sonuçları incelendiğinde (Şekil 4a) 2 aylık depolamaya alınan örneklerde en yüksek pH değeri kontrol örneğinde 3.51, en düşük değer ise MF513-MF179 nolu örnekte 3.30 olarak saptanmıştır. MF513, MF377 ve MF213 nolu örnek salamuralarının pH değerleri ise birbirine benzer bulunmuştur (pH 3.41). 4 aylık ve 6 aylık depolama örneklerinde benzer şekilde en düşük pH değeri MF513-MF179 nolu örnekte, sırasıyla 3.27 ve 3.21 olarak belirlenmiştir.

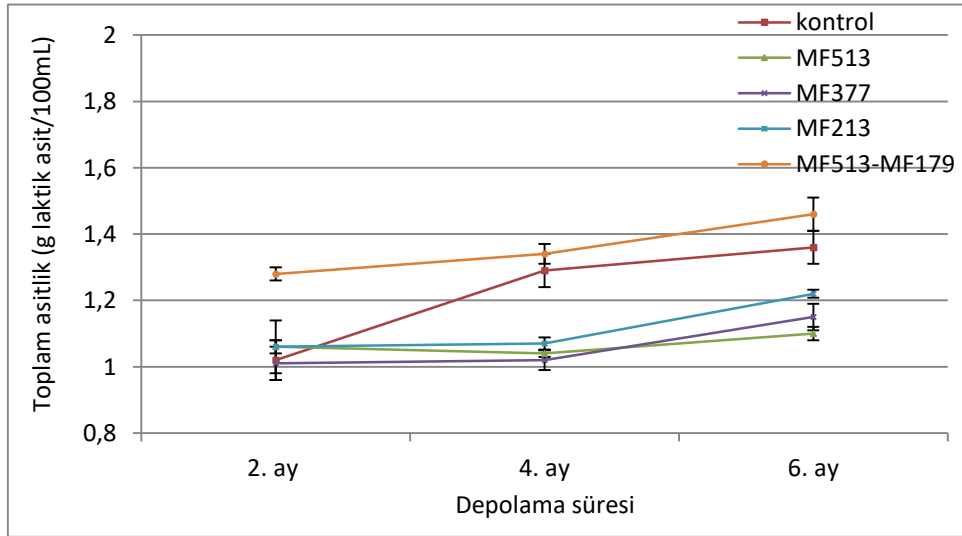
Depolanan örneklerde titrasyon asitliği değerleri (Şekil 4b) incelendiğinde, 2 aylık depolamaya alınan örneklerde en yüksek titrasyon asitliği

değeri MF513-MF179 nolu karışık kültür ile fermente edilen örnekte % 1.28 olarak, en düşük değer ise MF377 nolu örnekte % 1.01 olarak saptanmıştır. MF513, MF213 ve kontrol örneklerinde ortalama titrasyon asitliği değeri 1.05 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ulaşılan titrasyon asitliğine ait sonuçlar ile Etchells ve ark. (1975)' in 3 ay depolama sonucu belirttiği ortalama % 0.60-1.46 değerleri arasında benzerlik bulunmaktadır. 4 aylık depolamaya alınan örneklerde en yüksek titrasyon asitliği değeri MF513-MF179 nolu karışık kültür ile üretilen

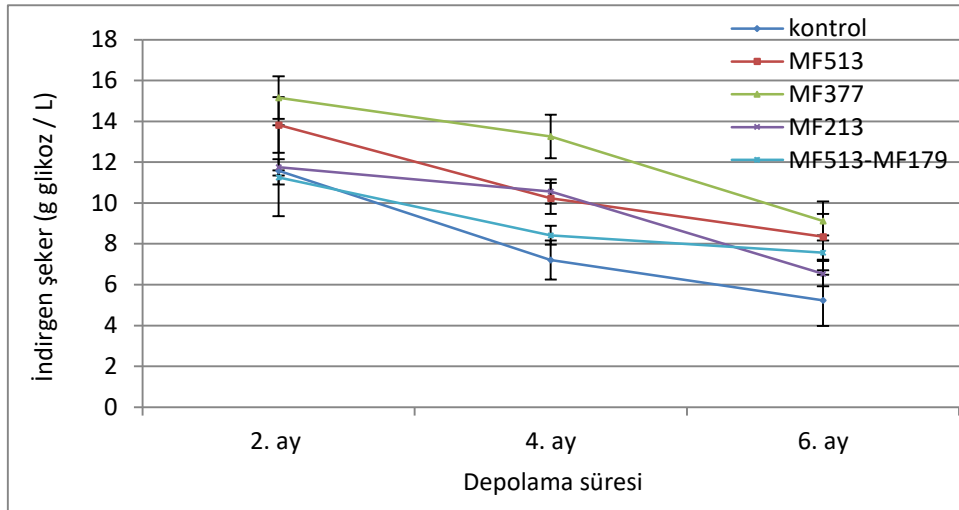
turşularda % 1.34; en düşük titrasyon asitliği ise MF377 nolu örnekte % 1.02 olarak bulunmuştur. 6 aylık depolamaya alınan örneklerde en yüksek titrasyon asitliği değeri MF513-MF179 nolu örnekte % 1.46; en düşük değer ise MF513 nolu örnekte % 1.10 olarak belirlenmiştir. 2, 4 ve 6 aylık depolama örneklerine ait salamuraların tümü incelendiğinde, en yüksek titrasyon asitliği değeri, ortalama % 1.26 ile 6 aylık turşularda, en düşük değer ise ortalama % 1.09 ile 2 aylık turşu örneklerinde ortaya çıkmıştır.



a



b



c
Şekil 4. Depolama süresince salamura örneklerinde a) pH, b) titrasyon asitliği ve c) indirgen şeker değerleri

Figure 4. Changes in brine samples during storage a) pH, b) titratable acidity and c) reducing sugar

2 aylık depolanan örneklere ait indirgen şeker miktarlarının ise MF377 ve MF513 nolu örnekte en yüksek değerlerde (15.16 ve 13.82 g/L) bulunduğu, ancak diğer örneklerde de kalan şeker miktarının da oldukça yüksek değerlerde olduğu görülmektedir. 4 ve 6 aylık depolanan örneklerde ise daha düşük miktarlarda indirgen şeker belirlenmiştir (Şekil 4c). Fermantasyon sonunda kalan şeker düzeyinin bu denli yüksek olması, muhtemelen şeker dışında diğer indirgen maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Depolama denemesi sırasında farklı salamuralardan elde edilen mikrobiyel sayımların ortalama sonuçları, Şekil 5'te verilmiştir. LAB sayısı 2 aylık örneklerde en fazla 6.05 log kob/mL ile MF213 nolu örnekte, en az 3.27 log kob/mL ile MF513-MF179 nolu örnekte bulunmuştur. Toplam mezofil bakteri sayısı 2 aylık örneklerde toplam LAB sayısında olduğu gibi en yüksek MF213 nolu örnekte, en düşük ise MF513-MF179 nolu örnekte tespit edilmiştir. Örneklerdeki toplam maya sayısı ise log 3.17-4.91 kob/mL aralığında bulunmuş olup en yüksek maya içeriği MF377 nolu örnekte saptanmıştır. Araştırmamızda elde edilen bu sonuçlara göre, LAB popülasyonunun depolama süresince,

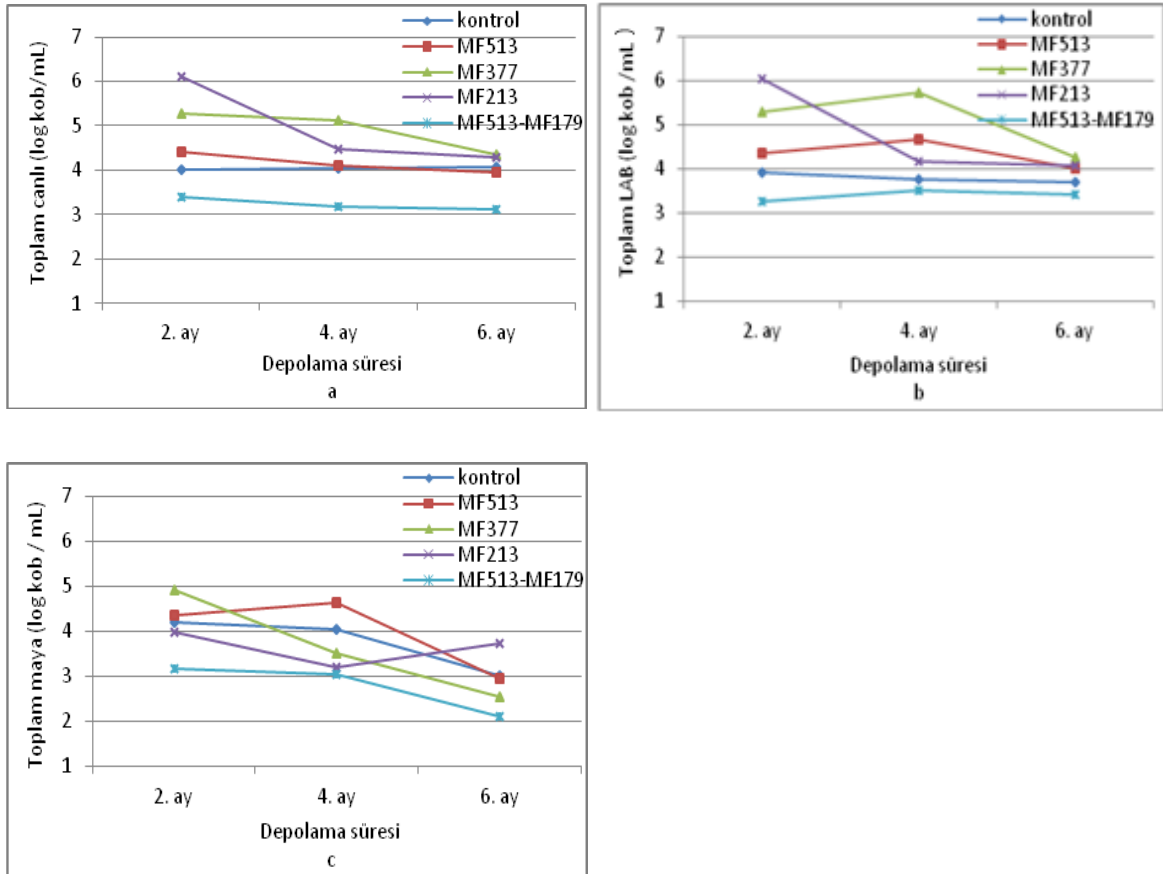
sayıları azalsa da, aktif kaldığı söylenebilir. Karışık starter kültürler kullanılarak üretilen ve depolanan MF513-MF179 kodlu örneklerin maya, LAB ve toplam mezofil mikrobiyel yükünün diğer örneklerle kıyasla daha düşük olması, bu turşu örneğinin daha yüksek asitlik ve düşük pH değeri ile de ilişkilendirilmiştir.

Depolama sonrası turşu örneklerinin şeker, organik asit kompozisyonu ve etil alkol oranları

Fermantasyon sırasında ve depolama aşamasında şeker ve organik asit kompozisyonlarının ve bunların miktarlarının belirlenmesi, fermantasyonda etkin bakteri grubunun belirlenebilmesi açısından bir yorum yapabilmeye olanak sağlayabilir. Örneklerin depolama sonunda HPLC ile şeker ve organik asit kompozisyonları belirlenmiş, bunlara ilaveten etil alkol miktarı da saptanmış; sonuçlar, 3 paralelin ortalaması olarak, Çizelge 3'te verilmiştir. Starter kültür kullanılan turşu örnekleri ile kontrol grubuna ait örnekte 6. ay depolama sonunda asetik asit miktarları benzer bulunmuş ve ortalama 0.26 g/100 mL olarak belirlenmiştir ($P > 0.05$). Fermantasyon denemelerinde elde edilen toplam asitlik sonuçlarında olduğu gibi depolama sonrası en

yüksek laktik asit miktarı MF513-MF179 suşlarının kullanıldığı turşu örneğinde belirlenmiş ve kontrol grubu turşu örneğinde benzer şekilde daha yüksek laktik asit miktarı ölçülmüştür ($P > 0.05$). En düşük laktik asit miktarı ise MF213 nolu turşu örneğinde belirlenmiş olup, 1.09 g laktik asit/100 mL olarak ölçülmüştür. Turşu örneklerinin 6 ay depolama sonrası kalan şekerlerin kompozisyonu incelenecek olursa, tüm örneklerin fruktoz miktarı glikoza kıyasla daha düşük belirlenmiştir. Özellikle 6. ay depolama sonunda laktik asit miktarı daha yüksek ölçülen MF513-MF179 nolu örnekte kalan fruktoz miktarının daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun, karışık kültür fermantasyonunda yer alan *L. plantarum* ve *P. ethanolidurans* suşlarının farklı şeker fermantasyon profiline sahip olması

ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tüm turşu örneklerinde depolama sonrası kalan glikoz miktarları ise benzer olarak bulunmuştur ($P > 0.05$). Fermantasyon sonrası oluşan ve ortamda kalan etil alkol miktarları incelenecek olursa, en yüksek alkol MF213 nolu örnekte 0.48 g/100 mL olarak ölçülmüş olup, kontrol ve MF513 nolu örneklerde de benzer alkol miktarları belirlenmiştir. Yüksek alkol miktarları fermantasyonda kullanılan şekerlerin asit oluşumu ile birlikte alkol üretimine harcadığının göstergesi olmaktadır. Fermantasyon ortamında bulunan maya hücreleri alkol üretiminde temel sorumlu florayı oluşturmaktadır. Depolama sonrası MF213 nolu turşu örneğinde ölçülen düşük laktik asit miktarı ve maya yükü bu sonuçları destekler niteliktedir.



Şekil 5. Depolama süresince salamuradaki mikrobiyolojik sayım sonuçları (log kob/mL) a) Toplam mezofilik aerobik bakteri b) Toplam LAB c) Toplam maya-küf

Figure 5. Results of microbiological counting in brine during storage (log cfu/mL) a) Total mesophilic aerobic bacteria b) Total LAB c) Total yeast-mold

Çizelge 3. 6 ay süre ile depolanan turşu örneklerine ait şeker, organik asit dağılımı ve etil alkol miktarları (g/100 mL)

Table 3. Sugar, organic acid distribution and ethyl alcohol content (g/100 mL) of pickle samples stored for 6 months

	Fruktoz	Glikoz	Etanol	Asetik asit	Laktik asit
Kontrol	0.10±0.12 ^{ab}	0.44±0.26 ^a	0.37±0.14 ^{ab}	0.26±0.01 ^a	1.49±0.43 ^{abc}
MF513	0.21±0.05 ^a	0.60±0.16 ^a	0.38±0.10 ^{ab}	0.25±0.00 ^a	1.29±0.11 ^b
MF377	0.20±0.15 ^a	0.74±0.10 ^a	0.27±0.02 ^b	0.25±0.00 ^a	1.34±0.23 ^{bc}
MF213	0.16±0.04 ^a	0.55±0.16 ^a	0.48±0.11 ^a	0.26±0.02 ^a	1.09±0.04 ^c
MF513-MF179	0.02±0.01 ^b	0.74±0.08 ^a	0.26±0.02 ^b	0.26±0.00 ^a	1.62±0.02 ^{ab}

*abc: İstatistiksel olarak aynı sütundaki veriler arasındaki benzerlik ($P < 0.05$)

SONUÇ

Starter kültür kullanılarak üretilen turşularda duyuşsal olarak belirgin bir üstünlük belirlenememesine karşın, laktik asit fermantasyonunu kısa sürede tamamlamış olmaları nedeniyle, starter kullanımının fermantasyonun seyrine önemli bir katkıda bulunduğu anlaşılmaktadır. Turşu üretiminde starter kullanımı, fermantasyonun güvenle tamamlanmasına ve standart özelliklere sahip ürün oluşumuna verdiği katkı nedeniyle, üreticilere tavsiye edilebilir. Yapılan bu çalışma ile tanımlanmış ve karakterize edilmiş starter kültürler tarafından turşu fermantasyonlarının daha kontrollü ve güvenilir bir şekilde yürütülmesi sağlanarak, endüstriyel turşu üretimleri için kaynak oluşturması hedeflenmiştir. Özellikle karışık starter kültürlerin fermantasyonlarda kullanımı her bir kültürün sahip olduğu farklı teknolojik özelliklerin bir arada kullanımına fırsat verecektir. Spontan fermantasyonlardaki en büyük sorun olan standardizasyon ve ürün güvenliği bu şekilde daha iyi sağlanabilecektir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje No. 108O491) tarafından desteklenen projenin bir bölümüdür.

KAYNAKLAR

Akpınar-Bayizit, A., Özcan-Yılsay, T., Yılmaz, L. (2007). Study on the use of yoghurt, whey, lactic acid and starter culture on carrot fermentation. *Pol. J. Food. Nutr. Sci.*, 57(2): 147-150.

Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R., Gorbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(5): 2011-2020.

Bağder Elmacı, S., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F., Şanlıbaba, P. (2015). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia Microbiol.*, 60: 241-251.

Breidt, F., McFeeters, R. F., Perez-Diaz, I., Lee, C. (2013). *Fermented vegetables. In Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.* Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Ed.), ASM Press, Washington D.C., pp. 841-855.

Çetin, B. (2011). Production of probiotic mixed pickles (Turşu) and microbiological properties. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(66): 14926-14931.

Çon, A.H., Karasu, N. (2009). Determination of antagonistic starter cultures for pickle and olive fermentation processes. *Czech. J. Food. Sci.*, 27(3): 185-193.

Daeschel, M.A., Fleming, H.P. (1984). Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentations. *Food Microbiol.*, 1: 303-313.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.*, 33(1): 1-10.

Erten, H., Boyacı-Gündüz, C.P., Ağırman, B., Cabaroğlu, T. (2016). Fermentation, Pickling, and Turkish Table Olives. In: *Handbook of Vegetable*

- Preservation and Processing*, Hui, Y.H., Evranuz, E.Ö., Bingöl, G., Erten, H., Jaramillo-Flores, M.E. CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, pp. 209-230.
- Etchells, J.L., Fleming, H.P., Bell, T.A. (1975). *Factor influencing the growth of lactic acid bacteria during brine fermentation of cucumbers; Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*. Carr, J.G., Cutting, C.V., Whiting G.C. (Ed), Academic Press, New York, pp. 281-305.
- Forouchi, E., Gunn, D.J. (1983). Some effects of metal ions on the estimation of reducing sugars in biological media. *Biotechnol. Bioeng.*, 25: 1905-1911.
- Gardner, N.J., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., Champagne, C.P. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. J. Food Microbiol.*, 64: 261-275.
- Gürgün, V., Halkman, A.K. (1988). *Mikrobiyolojide sayım yöntemleri*. Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara, 146 s.
- Holzapfel W. (2014) *Advances in fermented foods and beverages: improving quality, technologies and health benefits*. Woodhead Publishing, Elsevier, 541p.
- Hutkins, R.W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, USA, pp.233-259.
- Kamda, A.G.S., Ramos, C.L., Fokou, E. (2015). In vitro determination of volatile compound development during starter culture controlled fermentation of Cucurbitaceae cotyledons. *Int. J. Food Microbiol.*, 192: 58-65.
- Kamdee, S., Plengvidhya, V., Chokesajjawatee, N. (2014). Changes in lactic acid bacteria diversity during fermentation of sour pickled mustard green. *KKU Res. J.*, 19: 26-33.
- Karasu, N., Şimşek, Ö., Çon, A.H. (2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. *Ann. Microbiol.*, 60: 227-234.
- Kim, Y., Adachi, Y. (2007). Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Mic. Immunol.*, 51: 919-928.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Mäkimattila, E., Kahala, M., Joutsjoki, V. (2011). Characterization and electrotransformation of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paraplantarum* isolated from fermented vegetables. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 371-379.
- Montet, D., Ray, R.C., Zakhia-Rozis, N. (2014). *Lactic Acid Fermentation of Vegetables and Fruits. In Microorganisms and fermentation of traditional foods*. Ray, R.C., Montet, D. (Ed.), CRC Press., pp. 108-140.
- Nguyen, D.T., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Binh Thanh, L., (2013). A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *Int. J. Food. Microbiol.*, 163(1): 19-27.
- Nilchian, Z., Sharifan, A., Rahimi, E., Mazid Abadi, N. (2016). Improvement of fermented cucumber characteristics by starter culture of *Lactobacillus plantarum*, *L. bulgaricus* and *S. thermophiles*. *J. Food Biosci. Technol.*, 6(2): 31-40.
- Özer, C., Kalkan Yıldırım H. (2018). Production of pickles by mixed culture fermentation. *The American J. of Chem. and App.*, 5: 57-68.
- Peréz-Díaz, I.M., Breidt, F., Buescher, R.W., Arroyo-López, F.N., Jiménez-Díaz, R., Garrido-Fernández, A., Johanningsmeire, S.D. (2013). *Fermented and acidified vegetables*. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association, Washington DC, pp. 521-532.
- Shinagawa, H., Nishiyama, R., Miyao, S., Kozaki, M. (1997). Organic acid composition and quality of Japanese "shibazuke" pickles. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 3(2): 170-172.
- Swida, K.M., Binek, M. (2005). Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Polish J. of Mic.*, 54: 287-294.

- Tokatlı, M., Dursun, D., Arslankoz, N., Şanlıbaba, P., Özçelik, F. (2012). Turşu üretiminde laktik asit bakterilerinin önemi. *Akademik Gıda*, 10(1): 70-76.
- Tokatlı, M., Elmacı, S.B., İşleyen, N.A., Özçelik, F. (2017). Technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles. *The Journal of Food*, 42(6): 693-707.
- Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. (2015). In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. *Biomed Res. Int.*, 1-8.
- Tomlins, K.I., Baker, D.M., McDowell, I.J. (1990). HPLC method for the analysis of organic acids, sugars, and alcohol in extracts of fermenting cocoa beans. *Chromatographia*, 29(11-12): 557-561.
- Wu, C., Zheng, J., Huang, J., Zhou, R. (2014). Reduced nitrite and biogenic amine concentrations and improved flavor components of Chinese sauerkraut via co-culture of *Lactobacillus plantarum* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Ann. Microbiol.*, 64: 847-857.
- Xia, Y., Liu, X., Wang, G., Zhang, H., Xiong, Z., Sun, Y., Ai, L. (2017). Characterization and selection of *Lactobacillus brevis* starter for nitrite degradation of Chinese pickle. *Food Control*, 78: 126-131.

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Yüksel, M., Sert, S., Çetin, B. *Determination of microbiological quality and presence of Salmonella spp. on chicken parts sold at retail markets in Erzurum, antibiotic resistance of the Salmonella spp. isolates* / Erzurum'da satışa sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik kalitesi ve *Salmonella* spp. varlığının belirlenmesi, *Salmonella* spp. izolatların antibiyotik direnci.....553-562
- Gidado Mukhtar, Z., Salihu Ibrahim, M., Ibrahim Ibrahim, Y. Karatas, F. *Amounts of vitamin A, vitamin E, vitamin C, β-carotene, lycopene, ghrelin, glutathione, and MDA in fruits of Diospyros kaki L.* / Trabzon hurması (*Diospyros kaki L.*) meyvelerindeki A vitamini, E vitamini, C vitamini, β-karoten, likopen, grelin, glutatyon ve MDA miktarları 585-592
- Hepsağ, F. *Determination of total phenolic compounds and antioxidant capacity of Anzer honey produced in Rize, Turkey* / Rize'deki Anzer yaylası'nın endemik çiçeklerinden üretilen anzer balının toplam fenolik bileşiklerinin ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi641-653
- Dirim, S. N., Talih, M., Çalışkan Koç, G. *Dying characteristics of red beet (Beta vulgaris esculentacruenta) puree in a microwave oven* / Kırmızı pancar püresinin (*Beta vulgaris esculentacruenta*) mikrodalga fırında kuruma kinetiği654-671
- Cüce, M. *Determination of aflatoxin contents of Şebinkarahisar walnut variety by ELISA method* / Şebinkarahisar ceviz çeşidinde aflatoksin içeriğinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi672-680
- Topalcengiz, Z., Işık, S., Işık, H., Güner, S. *Survival of acid adapted and non-adapted stationary phase Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in pomegranate juice* / Aside adapte ve adapte olmayan durağan faz *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium ve *Listeria monocytogenes*'in nar suyundaki canlı kalma sürelerinin belirlenmesi681-691

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Turan, A., İslam, A. *Tombul fındık çeşidinde yağ oksidasyonunu azaltacak kurutma yönteminin belirlenmesi* / *Determination of drying method for reducing oil oxidation of Tombul (cv) hazelnut*.....563-575
- Aydemir, O. *Yeni bir ürün-kakaolu kestane kreması üretiminde kavurma sıcaklığının etkisi* / *The effect of roasting temperature in production of cocoa chestnut cream-a new product*576-584
- Gençdağ, E., Görgüç, A., Birişik, M., Genç, E., Başkurt, C., Yılmaz, F. M. *Kırmızı pancar suyu üretiminde enzim ön uygulaması: işlem koşullarının meyve suyu verimi, betanin miktarı, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerine etkisi* / *Enzymatic pre-treatment in red beet juice production: the effect of process variables on juice yield, betanin content, total phenolic compound and antioxidant capacity*593-604
- Yıldız Turgut, D., Çınar, O., Seçmen, T. *Farklı yöntemlerle elde edilen kamkat (Fortunella margarita swing.) tozlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi* / *Determination of functional properties of kumquat (Fortunella margarita swing.) powders obtained by different methods*605-617
- Severcan, S. S., Uzal, N., Kahraman, K. *PSF/SiO₂ nanokompozit membran üretimi ve elma suyu berraklaştırma prosesinde kullanımı* / *Fabrication of PSF/SiO₂ nanocomposite membrane and application in apple juice clarification process*.....618-628
- İncegül, Y., Çam, M. *Adayayı uçucu yağ eldesinden sonra arta kalan ürünlerin biyoaktif potansiyellerinin belirlenmesi* / *Determination of the bioactive potentials of sage (Salvia officinalis L.) by product after removal of essential oil*629-640
- Uçan Türkmen, F., Bingöl, B. N., Şahin, E., Özkaraman, F., Tekin, Z. *Erik (Prunus domestica) bazlı karışık meyveli geleneksel marmelat üretimi* / *Production of traditional marmalade with mixed fruit based plum (Prunus domestica)*.....707-718
- Ephrem Adifon, D., Tuncer, Y. *Peynirden izole edilen yüksek seviyede aminoglikozid dirençli enterokoklarda virülens faktörlerin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması* / *Investigation of virulence factors using phenotypic and genotypic methods in high-level aminoglycoside resistant enterococci isolated from cheese*719-732
- Cumhur, Ö. *Geleneksel gıdalardan Dartı'nın üretim yöntemi ve bazı özelliklerinin belirlenmesi* / *Determination of production method and some characteristics of Dartı from traditional foods*.....734-741
- Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N., Özçelik, F. *Seçilmiş endojen laktik starter kültürler ile turşu üretimi* / *Pickle production by selected indigenous lactic starter cultures*.....742-757

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Emenli, İ., Tiryaki Gündüz, G. *Gıdalarda bulunan küflerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler* / *Methods for identification of molds in foods* ... 692-706