

GIDA

THE JOURNAL OF FOOD



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 46

SAYI / NUMBER : 3

YIL / YEAR : 2021

GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

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*

Baş Editör/ Editor-in Chief	Danışma Kurulu / Advisory Board
ERİNÇ, Hakan; <i>Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey</i>	Akköse, Ahmet; <i>Atatürk University, Turkey</i> Ank, Gökşen G.; <i>Balıkesir University, Turkey</i> Atalar, İlyas; <i>Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey</i> Baysal, A. Handan; <i>İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Turkey</i> Bezirtzoğlu, Eugenia; <i>Democritus University of Thrace, Greece</i> Bozkır, Hamza; <i>Sakarya Uygulamalı Bilimler University, Turkey</i> Çilak, Gizem Ö.; <i>Hittit University, Turkey</i> Draughon, Ann <i>Tennessee University, USA</i> El Soda, <i>Morsi University of Alexandria, Egypt</i> Erbay, Zafer; <i>Adana Bilim ve Teknik University, Turkey</i> Evren, Mustafa; <i>Ondokuz Mayıs University, Turkey</i> Fogliano, Vincenzo <i>University of Napoli Federico II, Italy</i> Gerçekaslan, K. Emre; <i>Neşehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey</i> Ghosh, Bikash C. <i>National Dairy Research Institute, India</i> Gollop, Natan <i>The Volcani Center, ARO, Israel</i> Griffiths, Mansel <i>University of Guelph, Canada</i> Güneşer, Onur; <i>Uşak University, Turkey</i> Güven, Esra Ç.; <i>İstanbul Teknik University, Turkey</i> Ho, Chi-Tang <i>The State University of New Jersey, USA</i> Hoşoğlu, Müge I.; <i>Gebze Teknik University, Turkey</i> Hüner, İrem D.; <i>Trakya University, Turkey</i> Kahraman, Kevser; <i>Abdullah Gül University, Turkey</i> Karaca, Hakan; <i>Pamukkale University, Turkey</i> Koçan, Deniz; <i>Aksaray University, Turkey</i> Konuşkan, Dilşat B.; <i>Mustafa Kemal University, Turkey</i> Kuleşan, Hakan; <i>Süleyman Demirel University, Turkey</i> Meral, Raciye; <i>Yüzüncü Yıl University, Turkey</i> Mete, Aylin A.; <i>Mersin University, Turkey</i> Morales, Francisco J. <i>CSIC Instituto del Fr o, Spain</i> Muhtaba, Mustafa G. <i>Florida Gulf Coast University, USA</i> Mutlu, Türkan K.; <i>Çukurova University, Turkey</i> Öztürk, Fatma; <i>Kâtip Çelebi University, Turkey</i> Paalme, Toomas <i>Tallinn University of Technology, Estonia</i> Parlar, Harun <i>Technical University of Munich, Germany</i> Raspor, Peter <i>University of Primorska, Slovenia</i> Rezessy-Szabo, Judit M. <i>Corvinus University of Budapest, Hungary</i> San, Ferda; <i>Cumburiyet University, Turkey</i> Şengün, İlkin Y.; <i>Ege University, Turkey</i> Soyer, Yeşim; <i>Orta Doğu Teknik University, Turkey</i> Toğay, Sine Ö.; <i>Bursa Uludağ University, Turkey</i> Toker, Ömer S.; <i>Yıldız Teknik University, Turkey</i> Velioglu, Murat; <i>Namık Kemal University, Turkey</i> Yemiş, Gökçe P.; <i>Sakarya University, Turkey</i> Yolaçaner, Elif; <i>Hacettepe University, Turkey</i> Yorulmaz, Aslı; <i>Adnan Menderes University, Turkey</i> Zorba, Murat; <i>Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey</i>
Editörler / Editors AVCI, Ayşe; <i>Sakarya University, Turkey</i> DEMİROK SONCU, Eda; <i>Ankara University, Turkey</i> TORUN, Mehmet; <i>Akdeniz University, Turkey</i> DEMİRKESEN, Mert; <i>İlkem, Tarım ve Orman Bakanlığı, TAGEM, Turkey</i>	
Yönetim Yeri Adres / Address Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey Tel: (+90) 0534 968 5994 • Faks: (+90) 312 317 8711 E-posta / E-mail: dergi@gidadernegi.org URL: http://www.gidadernegi.org	
Yayın Türü: Yaygın süreli ve hakemli	
Hazırlayan / Prepared Sim Ajans 19. Sokak No: 47/1 Emek / Ankara Tel : (+90) 312 925 25 95 e-mail: simajans@simajans.com	
Yayın Tarihi / Publication Date 15 06 2021	

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

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

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Kavaz Yüksel, A., Yüksel, M. *Determination of certain microbiological parameters on cheese samples collected from supermarkets in Erzurum* / Erzurum'da süpermarketlerden toplanan peynir örneklerinde belirli mikrobiyolojik parametrelerin belirlenmesi **489-499**
- Ansoy, Z., Öner, Z. *Determination of the factors that cause bitterness during shelf-life in white cheese produced using ultrafiltered milk* / UF beyaz peynirde raf ömrü boyunca acılaşmaya neden olan faktörlerin belirlenmesi **552-565**
- Demir, T., Andic, S. *Comparison of some properties of butter oil produced from cultured and uncultured butter at different temperatures* / Kültürlü ve kültürsüz tereyağlarından farklı sıcaklıklarda üretilen sadeyağların bazı özelliklerinin karşılaştırılması **621-633**
- Barut Gök, S. *Effect of UV-C treatment on microbial population and bioactive compounds of orange juice using modified reactor based on dean vortex flow* / Dean girdabı akışına dayalı reaktör tasarımı ile UV-C uygulamasının portakal suyunun mikrobiyal yükü ve biyoaktif bileşenlerine etkisi **634-646**
- Aydın, E. *Attributes of total phenolic content, antioxidant capacity and in-vitro simulated bioaccessibility of astringent, non-astringent and wild (rootstock) persimmons* / Buruk, buruk olmayan ve yabani (anaç) hurmaların toplam fenolik bileşen, antioksidant kapasite ve in-vitro simule edilmiş biyoalınabilirlik özellikleri **669-680**
- Duran, A. *The effect of bovine lactoferrin on the microbiological properties of raw milk* / Sığır laktoferrinin çiğ sütün mikrobiyolojik özelliklerine etkisi **681-691**
- Guliyeva, F., Sadettin, S. *Assessment of physicochemical and sensory quality of beef patties formulated with pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) powder* / Yarpuz (*Mentha pulegium* L.) tozu ile formüle edilen sığır köfelerinin fizikokimyasal ve duyu kalitesinin değerlendirilmesi **739-750**

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Yerli, G. A., Özden Tuncer, B. *Koagülaz-negatif *Staphylococcus* (KNS) ve *Macrocooccus caseolyticus* suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin ve adezyon faktörlerinin araştırılması* / *Investigation of biofilm formation properties and adhesion factors of coagulase-negative *Staphylococcus* and *Macrocooccus caseolyticus* strains* **500-514**
- Dağdelen, A., Akman, N., Çağal, M. M. *GDO analizlerinde kullanılan CRM izolatlarının kontrollü muhafaza koşullarında tekrar kullanım olanaklarının araştırılması* / *Investigation of reuse capabilities of CRM isolates used in GMO analysis in the controlled storage conditions* **515-527**
- Rayman Ergün, A., Tekgül, Y. *Farklı karbonhidrat formülasyonları ile üretilmiş ayva suyu konsantresi katkılı sert şekerlerin kalite özelliklerinin incelenmesi* / *Investigating the quality characteristics of quince juice concentrate fortified hard candies produced with different carbohydrate formulations* **528-538**
- Akbalık, S., Oral, R. A., Dağdelen, A. F., Alkın, E., Uğur, N., Davarcı, B., Karataş, A. B. *Sağlam, M. Havuç cipsinde ideal üretim parametrelerinin belirlenmesi* / *Determination of optimum production parameters in carrot chips* **539-551**
- Yücel Şengün, İ., Yücel, E., Kılıç, G., Öztürk, B. *Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının yağ asidi kompozisyonu, biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi* / *Determination of fatty acid composition and bioactive properties of pumpkin seed and apricot kernel oils* **608-620**
- Diñçer, C., Çınar, A., Elmasulu, S. *Farklı mikrodalga güç seviyelerinde ve farklı fırın sıcaklıklarında kurutulan hibiskus çanak yapraklarının kuruma karakteristiklerinin ve bazı fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi* / *Determination of drying characteristics and some physicochemical characteristics of hibiscus calyx dried at different microwave power levels and different oven temperatures* **647-659**
- Kısa, Ç., Tuncer, Y. *Kanatlı etlerinde *Staphylococcus aureus* yaygınlığı ve antibiyotik direnc profillerinin, antibiyotik direnc ve enterotoksin genlerinin belirlenmesi* / *Determination of *Staphylococcus aureus* prevalence and antibiotic resistance profiles, antibiotic resistance and enterotoxin genes in poultry meats* **692-706**
- Yörük, N. G. *Kantitatif mikrobiyolojik analizlerde ölçüm belirsizliği hesaplanmasında farklı yaklaşımların karşılaştırılması* / *Comparison of various approaches in calculation of measurement uncertainty in quantitative microbiological analysis* **707-725**
- Turan, S., Atalay, D., Solak, R., Özogül, M., Demirtaş, M. *Ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin kuşburnu (*Rosa canina* L.) meyvesinin toplam fenolik ve karotenoid miktarları ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi* / *Effects of ultrasound-assisted extraction parameters on the total phenolic and carotenoid contents and antioxidant activity of rosehip (*Rosa canina* L.)* **726-738**
- Balcı-Torun, F., Özdemir, F. *Çilek aromasının depolama kararlılığı üzerine püskürtülerek kurutma yöntemiyle enkapsülasyon işleminin etkisi ve mikrokapsüllerin model gıdalarda etkinliğinin belirlenmesi* / *Influence of the spray-drying encapsulation on the storage stability of strawberry aroma and efficiency of microcapsules in model foods* **751-765**

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Cerit, Z. G., Baloğlu, M. C., Yılmaz, R. *Beyaz peynir mikrobiyotasında kültüromik ve shotgun metagenomik teknolojilerin değerlendirilmesi* / *Evaluation of culturomics and shotgun metagenomic technologies in white cheese microbiota* **566-582**
- Özdemir, E. E., Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F. M. *Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemlerinin temelleri ve bu yöntemler ile gıda atıklarından toz ürünlerin üretimi* / *Principles of spray drying and freeze drying techniques and their use in powder production from food wastes* **583-607**
- Başar, C. S., Heperkan, Z. D. *Sütün mikrobiyotası ve bozulmasına yol açan önemli bakteriler* / *Milk microbiota and its important spoilage bacteria* **660-668**

DETERMINATION OF CERTAIN MICROBIOLOGICAL PARAMETERS ON CHEESE SAMPLES COLLECTED FROM SUPERMARKETS IN ERZURUM

Arzu Kavaz Yüksel¹, Mehmet Yüksel^{*2}

¹Atatürk University, Technical Sciences Vocational School, Department of Food Processing, Erzurum, Turkey

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

Received / Geliş: 19.10.2020; Accepted / Kabul: 13.03.2021; Published online / Online baskı: 23.03.2021

Kavaz Yüksel, A., Yüksel M. (2021). Determination of certain microbiological parameters on cheese samples collected from supermarkets in Erzurum. GIDA (2021) 46(3) 489-499 doi: 10.15237/gida.GD20121

Kavaz Yüksel, A., Yüksel M. (2021). Erzurum'da süpermarketlerden toplanan peynir örneklerinde belirli mikrobiyolojik parametrelerin belirlenmesi. GIDA (2021) 46(3) 489-499 doi: 10.15237/gida.GD20121

ABSTRACT

This study aimed to evaluate 50 different cheese samples in terms of certain microbiological parameters. The presence of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. in cheeses were investigated by immunomagnetic separation and conventional methods. *Staphylococcus aureus* was detected in 4 samples, while 2 samples were accepted suspicious of *Salmonella* spp. and 5/50 samples were found positive with respect to *Listeria* spp. The suspicious *Salmonella* spp. isolates were determined as *Proteus mirabilis*. Therefore, *Salmonella* spp. were not determined from the samples. The isolates of *Listeria* spp. were identified as *Listeria monocytogenes* (2/5), *Listeria grayi* (3/5). According to antibiotic test results, *Staphylococcus aureus* isolates showed susceptibility to tetracycline, trimethoprim, gentamicin, chloramphenicol, sulphamethoxazole/trimethoprim, ciprofloxacin at the level of 100%. Additionally, the *Listeria* spp. isolates displayed high susceptibility to chloramphenicol, ciprofloxacin, and ampicillin.

Keywords: Cheese; *Salmonella*; *Listeria*; Immunomagnetic separation; Antibiotic resistance

ERZURUM'DA SÜPERMARETLERDEN TOPLANAN PEYNİR ÖRNEKLERİNDE BELİRLİ MİKROBİYOLOJİK PARAMETRELERİN BELİRLENMESİ

ÖZ

Bu çalışmanın amacı 50 farklı peynir örneğini belirli mikrobiyolojik parametreler açısından değerlendirmektir. Peynirlerde *Salmonella* spp. ve *Listeria* spp. varlığı immunomanyetik separasyon ve geleneksel metotlarla araştırılmıştır. 50 örneğin 5'i *Listeria* spp. açısından pozitif bulunurken, 4'ü *Staphylococcus aureus*, 2'si şüpheli kabul edilen *Salmonella* spp. olarak belirlendi. Şüpheli *Salmonella* spp. izolatları identifikasyon aşamasında *Proteus mirabilis* olarak tanımlandığından örneklerde *Salmonella* spp. tespit edilmemiştir. *Listeria* spp. izolatları *Listeria monocytogenes* (2/5), *Listeria grayi* (3/5) olarak tanımlandı. Antibiyotik test sonuçlarına göre, *Staphylococcus aureus* izolatları tetrasiklin, trimetoprim, gentamisin, kloramfenikol, sulfametoksazol/trimetoprim, siprofloksasin antibiyotiklerine %100 seviyesinde duyarlılık gösterdi. Ayrıca *Listeria* spp. izolatları kloramfenikol, siprofloksasin ve ampisilin antibiyotiklerine karşı yüksek duyarlılık sergilemiştir.

Anahtar kelimeler: Peynir; *Salmonella*; *Listeria*; immünomanyetik separasyon; antiyotik direnç

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉: mehmet.yuksel@atauni.edu.tr

☎: (+90) 442 231 5808

☎: (+90) 442 236 0958

Arzu Kavaz Yüksel ORCID ID: 0000-0001-8292-9259

Mehmet Yüksel ORCID ID: 0000-0001-6566-1385

INTRODUCTION

Cheeses are widely consumed by the majority of people because of their high nutritional value and unique taste and flavor. More than 1000 types of cheeses are produced and consumed around the World, while approximately, 40-50 types of cheese are known in Turkey (Hayaloglu et al., 2002).

The pasteurized dairy products are considered as safe products for consumption, but pathogenic bacteria contaminating the dairy products after pasteurization can be dangerous for human health. Generally, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* have been reported as important pathogenic microorganisms that cause food-borne diseases (McCabe-Sellers and Beattie, 2004). Generally, the sources of contamination were caused by raw milk, inadequate pasteurization of milk, post-pasteurization contamination of milk, inadequate milk handling procedures, and manufacturing process. Also, inadequate personal hygiene, ingredients, contaminated waters, post-production factors, poor sanitation, storage conditions, transportation, and temperature changes during the storage period cause spoilage and food-borne disease (Kanbakan et al., 2004; Reij and Aantraker, 2004).

Salmonella spp. are one of the most important pathogenic microorganisms that capable of causing salmonellosis in humans. *Salmonella* spreads by fecal wastes of the infected animals and humans (Ponce et al., 2008; Abulreesh, 2012).

From among *Listeria* spp., *L. monocytogenes* cause human listeriosis and *L. ivanovii* is mainly pathogenic for animals, primarily sheep. *L. monocytogenes* is a psychrotroph microorganism and it can grow at relatively low pH and refrigeration temperature. The first major source of food contamination by *L. monocytogenes* might stem from the cross-contamination during the food processing such as cheese-making process (Arsalan and Ozdemir, 2008).

The immunomagnetic separation (IMS) technique has been used as an effective and rapid method for the detection of *Salmonella* spp. and *Listeria*

spp. from foods (Lynch et al., 2004; Ayaz and Erol, 2009). Recently, immunomagnetic separation (IMS) overcomes the matrix effect and is used for the enumeration of bacteria. IMS can eliminate the potential interferences and it has been applied to conduct measurements in the food matrix, thereby bacteria can be captured easily. The IMS pretreatment can improve the concentration of target bacteria, in this way reducing analysis time and improving detection sensitivity (Bi et al., 2020; Akçınar et al., 2020).

The aim of this study was the detection of *S. aureus*, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. from cheese samples by IMS and conventional methods. We also determined the total aerobic mesophilic bacteria (TAMB), lactic acid bacteria (LAB), yeast/mold, psychrotrophic bacteria, and coliform bacteria counts in different cheese samples. The antibiotic susceptibility of confirmed isolates was evaluated with different antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

For this study, A total of 50 different cheese samples were collected as 10 samples per group (Civil, Tulum, Kaşar, Lor, White Cheese) from various supermarkets, between June 2015-July 2015. These cheeses were placed in packaging material and immediately transported to the laboratory and stored at 4 °C until analysis.

For microbiological analysis, 11 g of cheese were weighed for each sample and diluted aseptically in 99 mL sterile maximum recovery diluent (MRD) (0.85% NaCl+0.1% peptone). Serial decimal dilutions of samples were prepared with MRD. Total aerobic mesophilic bacteria count was enumerated using Plate Count Agar (PCA) Merck, 1.05463) at 30±1 °C for 48 h (Harrigan, 1998; Maturin and Peeler, 1998). The counts of lactic acid bacteria (LAB) were determined on de Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) (Oxoid, CM0361) at 37±1 °C for 48 h anaerobically (Dave and Shah, 1998). The yeast/molds were enumerated on Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, 1.10130) acidified with 10% lactic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 25±1 °C for 5-7 days (Herrera, 2001). The

psychrotrophic bacteria count was determined using PCA at 7-10 °C for 10 days. Total coliform counts of samples were counted by Violet Red Bile Agar (VRB) (Merck, 1.01406) at 37±1 °C for 48 h (Harrigan, 1998). The selective determination of *Escherichia coli* was performed using EC broth (Merck 1.10765) and Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar (EMB agar) (Rippey et al., 1987).

For *S. aureus* enumeration, serial dilutions of cheese homogenates were spread on Baird Parker Agar (BPA) (Merck, 1.05406) supplemented with egg yolk telluride and incubated at 37±1 °C for 24 to 48 h. Typical colonies were confirmed with coagulase, catalase activity, and DNase and TNase activity, haemolysis in blood agar tests (Bennett and Lancette, 2012).

For the isolation of *Salmonella* spp., 25 g sample was weighted to the sterile filter stomacher bags that have in 225 mL Buffered Peptone Water (BPW) and incubated at 37±1 °C for 18-24 h. Then, the other analyzes were made according to the ISO protocol (ISO, 2002; BAM, 2014). IMS method for *Salmonella* spp. were performed according to Kavaz Yüksel and Yüksel (2015) with minor modifications. 1 mL of pre-enriched sample was incubated with 20 µL Dynabeads® anti-*Salmonella* (Invitrogen, UK) in 2 mL microcentrifuge tube at room temperature for 15 min. Biochemical identification of suspicious *Salmonella* colonies was made using by API 20E test kit (BioMérieux, Inc., France) and conventional biochemical tests.

For the isolation of *Listeria* spp. 25 g of cheese samples were made in 225 mL half fraser broth (Oxoid, Basingstoke, UK). The other analyses for *Listeria* spp. were made according to Hitchens et al. (2016). The obtained colonies were confirmed using mobility test, biochemical tests (Gram stain, catalase, oxidase, urea, TSI, and MR-VP, β-hemolysis, CAMP test, and production of acids from rhamnose and xylose) and API Listeria (BAM, 2014). The enrichment stage of *Listeria* isolation by IMS was made similarly to the conventional method. IMS procedure for *Listeria* spp. was performed as previously explained in

Salmonella. Afterward, 100 µL of resuspended IMS mixture was plated on PALCAM agar, ChromoCult® Listeria Agar, Oxford Listeria agar and then same procedures were followed as described for the conventional method.

The antibiotic susceptibility tests of the isolates were made using Kirby-Bauer Disk diffusion protocol according to the standard of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2014). Firstly, 5 mL sterile 0.85% NaCl solutions were prepared for each isolate and densities of them were controlled with a MacFarland 0.5 standard. Then the solutions were spread to the Mueller Hinton agar (Oxoid, CM0337) with a sterile cotton swab. Antibiotic disks including, Tetracycline (TE, 30 µg, Oxoid CT054B), Streptomycin (S, 10 µg, Oxoid CT047B), Trimethoprim (TMP, 5 µg, Oxoid CT076B), Gentamicin (CN, 10 µg, Oxoid CT024B), Kanamycin (K, 30 µg, Oxoid CT026B), Chloramphenicol (C, 30µg, Oxoid CT013B), Sulphamethox/Trimethoprim (SXT, 5 µg, Oxoid CT052B), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg, Oxoid CT425B), Ampicillin (AMP, 10 µg, Oxoid CT003B) and Nalidixic Acid (NA, 30 µg, Oxoid CT031B) were placed onto the inoculated surface of Mueller Hinton agar. The plates were incubated at 37±1 °C for 24 hours and diameters of clear zones were measured using a ruler in terms of millimeters (CLSI, 2014).

The obtained data were analyzed using the SPSS statistical software program version 13 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range tests were used to determine the differences between results.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the general microbiological properties of the cheese samples are presented in Table 1.

The highest mean counts of TAMB were found in samples of 11, 15, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29, and 30, while the lowest mean value was determined in sample 39.

Table 1. The certain viable bacteria count of different cheese samples.

Cheese samples	TAMB count (log CFU/g)	Lactic acid bacteria count (log CFU/g)	Yeast / mold count (log CFU/g)	Psychotropic bacteria count (log CFU/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> count (log CFU/g)	Coliform bacteria count (log CFU/g)	EC broth results	<i>E. coli</i> (EMB)
1	7.77	8.00	7.75	7.11	<10*	5.12	+	+
2	7.48	6.63	4.21	7.94	<10	7.84	+	+
3	7.83	7.49	4.29	8.06	<10	8.11	+	+
4	7.26	6.63	3.46	7.36	<10	7.48	+	+
5	6.36	6.95	5.23	6.19	<10	<10	-	-
6	6.40	6.86	4.60	5.96	<10	<10	+	+
7	7.23	8.00	6.42	7.30	<10	4.71	+	+
8	8.52	8.16	4.45	8.08	<10	7.08	+	+
9	7.72	7.64	4.30	7.45	<10	6.45	+	+
10	7.20	8.24	5.79	8.43	<10	4.11	+	+
11	11.00	7.00	5.94	11.00	7.91	7.52	+	+
12	7.62	7.96	5.84	5.52	<10	1.70	+	+
13	7.99	8.12	6.77	7.79	<10	8.00	+	+
14	6.49	6.03	2.00	6.08	<10	5.54	+	+
15	11.00	8.48	6.11	11.00	7.36	8.00	+	+
16	8.60	7.89	2.70	8.30	<10	7.72	+	+
17	9.16	8.30	6.69	8.86	<10	8.00	+	+
18	8.14	8.16	6.38	8.45	<10	7.14	+	+
19	7.81	7.68	4.85	7.42	<10	8.00	+	+
20	9.15	9.54	6.09	9.28	<10	7.03	+	+
21	11.00	7.11	6.33	11.00	<10	2.59	+	+
22	11.00	6.44	<10	11.00	<10	2.65	+	+
23	11.00	8.02	4.02	11.00	5.36	7.88	+	+
24	7.08	7.12	3.85	5.32	<10	2.00	+	+
25	6.33	8.19	5.88	6.14	<10	<10	+	+
26	11.00	11.00	7.10	11.00	<10	3.41	+	+
27	11.00	11.00	4.37	11.00	6.48	5.90	+	+
28	11.00	11.00	3.49	11.00	<10	<10	-	-
29	11.00	11.00	4.11	11.00	<10	3.05	-	-
30	11.00	11.00	4.52	11.00	<10	1.48	+	+
31	8.45	8.63	6.83	8.48	<10	5.94	+	+
32	7.34	7.53	6.53	6.30	<10	3.98	-	-
33	8.51	8.26	3.08	5.99	<10	7.70	+	+
34	8.23	9.26	2.90	6.30	<10	6.00	+	+
35	6.13	6.14	<10	4.00	<10	4.42	+	+
36	8.78	8.38	5.82	7.95	<10	7.42	+	+
37	8.73	6.68	<10	8.77	<10	7.73	+	+
38	8.28	8.10	8.20	8.19	<10	2.30	+	+
39	5.40	6.64	7.38	4.00	<10	2.48	+	+
40	6.24	6.19	4.77	<10	<10	<10	+	+
41	6.41	5.99	5.09	7.79	<10	8.00	+	+
42	6.82	6.79	<10	5.23	<10	<10	-	-
43	8.59	8.05	5.19	7.01	<10	5.13	+	+
44	9.25	8.23	5.74	6.60	<10	5.60	+	+
45	8.61	9.11	5.56	8.35	<10	8.74	+	+
46	8.30	8.10	6.14	6.30	<10	5.78	+	+
47	8.39	7.95	4.31	8.40	<10	7.70	+	+
48	9.49	8.30	6.60	8.52	<10	7.20	+	+
49	7.90	8.49	3.48	6.92	<10	5.30	+	+
50	8.39	8.32	7.93	6.57	<10	3.30	-	-

<10*: CFU/g

The cheese-making process is based on the application of lactic acid bacteria (LAB) that are expected to cause rapid acidification of milk and decrease in pH consequently (Briggiler-Marcó et al., 2007). The highest mean lactic acid bacteria counts were determined in samples 26, 27, 28, 29, and 30. The lowest mean value was found in sample 41 (5.99 log CFU/g). Yeasts and molds are important microbial contaminants for the dairy industry. The presence of theirs in cheese may cause serious problems (Borelli et al., 2006). The average numbers of yeasts/molds on the samples were between <10 CFU/g (Samples 22, 35, 37 and 42) - 8.20 log CFU/g (Sample 38). The psychrotrophic microorganisms are the most important group of microorganisms found in dairy products. Their heat-resistant enzymes such as protease and lipase cause some serious problems including proteolysis, lipolysis, rancidity and putrefaction (Özer and Yaman, 2014). The highest mean values of psychrotrophic bacteria were found in samples 11, 15, 21, 22, 23, 26, 27, 28, 29 and 30, while the lowest mean count was determined in sample 40.

The presence of coliform bacteria, *S. aureus*, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in foods are accepted as hygiene index. According to the Turkish Food Codex (Anonymous, 2011), the highest level of coliform bacteria that is allowed <10 CFU/g, also fecal coliforms should not be found in samples. On the other hand, *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. should not be found in 25 g cheese sample. Observing the obtained results, the coliform group microorganisms were determined as <10 CFU/g in samples 5, 6, 25, 28, 40 and 42, while the highest mean value was found in sample 45. When EC broth results were observed, only six samples (Samples 5, 28, 29, 32, 42 and 50) were found negative in terms of fecal coliform. EMB agar results showed that *E. coli* were determined samples of 44/50. The results showed that 92% (44/50) of the cheese samples were not suitable to standards in terms of coliform bacteria count and the presence of fecal coliform. On the other hand, 92% (44/50) of the cheeses were not suitable for *E. coli*. The prevalence of *E. coli* in various types of cheese samples was reported

between 4% and 74.3% by several researchers (Öksüztepe et al. 2009; Brooks et al. 2012).

It can be assumed that the presence of all of these microorganisms in the observed cheeses has been attributed to the using milk, starter culture and rennet, process conditions, equipment, workers and air of the environment.

S. aureus is one of the most important disease-affecting microorganisms for human health. The diseases caused by *S. aureus* occur due to the consumption of contaminated food that is containing one or more enterotoxins produced by *S. aureus* (Le Loir et al., 2003). In this study, four (samples of 11, 15, 23 and 27) cheese samples were found positive in terms of *S. aureus* presence. The highest mean *S. aureus* count was determined in sample 11 and followed by samples 15, 27 and 23, respectively. The obtained results were confirmed by the tests of coagulase, catalase activity, DNase-TNase activity and haemolysis in blood agar. After these processes, *S. aureus* was determined from four cheeses samples. According to Anonymous (2011), *S. aureus* should be found between the 1.0×10^2 - 1.0×10^3 CFU/g. Four samples do not comply with the standards in terms of *S. aureus* count. There are several studies on the presence and growth activities of *S. aureus* in various types of cheese produced in different cities in the Turkey. Bingöl and Toğay (2017) reported that were positive for *S. aureus* and that %34 from 52 Urfa cheeses in different conditions. The results were probably caused by the using milk, production and storage conditions. Also, the manufacturing process has been demonstrated to be the source of high *S. aureus* numbers (Saadat et al., 2014).

In this research, fifty (50) cheese samples were analyzed using conventional and IMS methods in terms of the presence of *Salmonella* spp. At the end of the isolation from 2 cheese samples (2/50) were determined as suspicious *Salmonella* spp. by IMS method. Then obtained colonies were examined with some analysis. During the examined procedure, *Salmonella* Typhimurium was used as a positive culture. The suspicious colonies were analyzed in terms of their oxidase activity. Then, oxidase negative colonies were

confirmed with API 20E test kit (BioMérieux, Inc., France) and conventional biochemical tests including verification of TSI and LIA agar. Finally, the obtained API 20E results were committed to the apiweb database (<https://apiweb.biomerieux.com>) and suspicion colonies were determined as *Proteus mirabilis* at the probability of 99%. In general, *Salmonella* and *Proteus* species may show similarity in terms of colony shapes and appearance in TSI and LIA agar. Some tests including hydrogen sulfide and acid production from lactose may be inadequate for the distinction of *Salmonella* spp. from other bacteria. In particular, *Proteus* species are lactose negative and sulphide positive, so they are not easily distinguishable from *Salmonella* spp. by using most commercial agar/broth (Rambach, 1990). Generally, the H₂S producing bacteria (such as *Proteus*) create colonies that have a black center with clear zone. However, XLD and XLT-4 Agars are the selective differential mediums used for the isolation and identification of gram-negative enteric pathogens. Generally, H₂S positive microorganisms, such as *Salmonella* spp. and *Proteus* spp., produces round black center colonies on these agars (Anonymous, 2014). There are wide variations among the contamination ratio of *Salmonella* spp., *Listeria* spp and other microorganisms in among cheese samples according to cheese typing. In our country and other countries, various results were also showed the presence of *Salmonella* spp. in different types of cheeses. It was detected that 6 (2.4%) out of 250 cheese samples (Colak et al., 2007) and 3 (6%) of the 50 Van otlu (herby) cheese samples (Tekinsen and Özdemir, 2006). Contrary to these findings, *Salmonella* spp. were not found in 80 white cheese and 40 cecil cheese samples by Gulmez and Guven (2001) and 50 carra cheese samples by Aygun et al. (2005). According to Pamuk and Siriken (2018), *Salmonella* spp. were isolated from 21% (21/100) of which obtained from milk products (6 of tulum cheese and 15 of fresh soft cheese) in the Afyon. In contrast, it was not isolated from cecil cheese and pasteurized milk samples.

In this study, fifty (50) cheeses were used for the isolation and identification of *L. monocytogenes* by

using conventional and IMS methods. According to results, 5/50 cheese samples were determined as positive for *Listeria* spp. by these methods. The isolates confirmed with API *Listeria* (BioMérieux, Inc., France). The obtained data were transferred to the apiweb database (<https://apiweb.biomerieux.com>). These colonies in two cheese samples (2/50) were determined as *L. monocytogenes* at the probability of 99%, while the other colonies in three cheese samples (3/50) were identified as *L. grayi* at the probability of 99%.

The behavior of *L. monocytogenes* in different kinds of cheese during ripening has been widely studied by some authors around the World and our country. Sagun et al. (2001), Colak et al. (2007) and Bouayad and Hamdi (2012). The significantly higher contamination rate was noted for *L. monocytogenes* for cheese samples. Also, other studies are reported that *L. monocytogenes* can be found more frequently in raw milk samples and soft cheeses. In soft and semi-soft cheeses, the water activity is higher than in hard cheeses, allowing the growth of *L. monocytogenes* (Farber and Peterkin, 1991). Kızanlık and Göksoy (2018) reported that 10 cheese samples were contaminated with *Listeria* spp., from 120 cheeses samples and 7 of which were contaminated with *L. monocytogenes* (1 sample) and *L. ivanovii* (6 samples) that might also cause public health risks.

Antibiotic susceptibility test was applied to *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *L. grayi* isolates. For this purpose, 10 different kinds of antibiotics were used for the determination of antibiotic susceptibility of *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *L. grayi* isolates (Table 2, Table 3, and Table 4).

When the effects of 10 antibiotics on the *L. monocytogenes* and *L. grayi* were examined, 5 of the isolates (5/5; 100%) were found have resistance to NA. However, all of the isolates (5/5; 100%) showed susceptibility to the C, CIP and AMP. On the other hand, 3 of the isolates (3/5; 60%) were resistance to the TE, S and K, while 2 of them (2/5; 40%) showed resistance to TMP, CN and SXT (Table 2).

Certain microbiological parameters on cheese samples

Table 2. Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Listeria grayi* isolates isolates.

Antibiotic	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=4) %	<i>Listeria monocytogenes</i> + <i>Listeria grayi</i> (n=5) %
Tetracycline (TE)	100	40
Streptomycin (S)	75	40
Trimethoprim (TMP)	100	60
Gentamicin (CN)	100	60
Kanamycin (K)	75	40
Chloramphenicol (C)	100	100
Sulphamethox/ Trimethoprim (SXT)	100	60
Ciprofloxacin (CIP)	100	100
Ampicillin (AMP)	25	100
Nalidixic Acid (NA)	0	0

Recently, the antimicrobial resistance of bacteria has been considered as a major problem in terms of public health. The unconscious antibiotic usage of humans has caused the formation of antibiotic resistance to the pathogenic strains. Antibiotic

resistance of *S. aureus* has an important problem both the veterinary and health professions (Hosseini et al., 2010).

Table 3. The antimicrobial effects of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* in cheese samples.

Antibiotic	Sample no			
	11 (<i>S. aureus</i>) (Zone diameter, mm)	15 (<i>S. aureus</i>) (Zone diameter, mm)	23 (<i>S. aureus</i>) (Zone diameter, mm)	27 (<i>S. aureus</i>) (Zone diameter, mm)
Tetracycline	20.25±0.35Db	24.10±0.14Ca	21.50±0.71Db	24.00±0.00Ca
Streptomycin	15.15±0.21Fab	14.25±0.35Ebc	14.00±0.00Gc	16.15±0.21Fa
Trimethoprim	21.75±0.35Cb	21.00±0.00Db	24.00±0.00Ca	24.00±0.00Ca
Gentamicin	18.50±0.71E	20.50±0.71D	18.25±0.35F	20.25±0.35E
Kanamycin	0.00±0.00H	20.00±0.00D	20.00±0.00E	20.00±0.00E
Chloramphenicol	27.25±0.35Aa	24.25±0.35BCb	25.25±0.35Bb	22.25±0.35Dc
Sulphamethox/ Trimethoprim	28.25±0.35Ab	25.50±0.71Bc	28.00±0.00Ab	34.50±0.71Aa
Ciprofloxacin	27.75±0.35A	28.00±0.00A	28.75±0.35A	28.75±0.35B
Ampicillin	25.00±0.00Ba	15.25±0.35Eb	12.75±0.35Hc	15.25±0.35Fb
Nalidixic Acid	11.65±0.49G	11.65±0.49F	12.00±0.00H	11.65±0.49G

Different uppercase letters indicate significant differences ($P < 0.01$) among the antibiotics, while lowercase letters showed differences among the samples. Results are means (SD) of duplicate. The difference between samples is insignificant ($P > 0.01$).

Observing Table 3, the isolates of 15, 23 and 27 had the highest resistance to NA while, isolates of 11 showed the highest resistance to the K. The isolates of 11 and 27 showed susceptibility to SXT while, isolates of 15 and 23 were susceptible to

CIP. According to Table 2, there were statistically significant ($p < 0.01$) differences between the samples with respect to antibiotic susceptibility and resistance.

Table 4. The effects of different antibiotics on the *Listeria grayi* and *Listeria monocytogenes* in cheese samples.

Antibiotic	Sample no				
	1 (<i>L. grayi</i>) (Zone diameter, mm)	6 (<i>L. grayi</i>) (Zone diameter, mm)	30 (<i>L. grayi</i>) (Zone diameter, mm)	38 (<i>L. monocytogenes</i>) (Zone diameter, mm)	47 (<i>L. monocytogenes</i>) (Zone diameter, mm)
Tetracycline (TE)	8.00±0.00Gb	33.50±2.12Aa	8.25±0.35Db	11.25±0.35Db	11.00±0.00Db
Streptomycin (S)	14.00±0.00Fb	18.50±2.12Ba	13.90±0.14 CDb	8.25±0.35Ec	0.00±0.00Ed
Trimethoprim (TMP)	20.50±0.71Ca	25.50±4.95ABa	21.00±0.70ABCa	0.00±0.00Fb	0.00±0.00Eb
Gentamicin (CN)	16.25±0.35Eab	23.50±6.36ABa	14.15±0.21BCDab	10.25±0.35Db	10.25±0.35Db
Kanamycin (K)	17.25±0.35Eab	25.00±7.07ABa	16.00±0.00BCab	10.25±0.35Db	10.25±0.35Db
Chloramphenicol (C)	20.50±0.71Cbc	33.00±1.41Aa	19.25±0.35ABCc	23.25±0.35Bb	23.25±0.35Bb
Sulphamethox/ Trimethoprim (SXT)	18.75±0.35Da	19.00±1.41Ba	17.50±0.71ABCa	0.00±0.00Fb	0.00±0.00Eb
Ciprofloxacin (CIP)	22.75±0.35Bab	21.50±0.71ABbc	24.75±0.35Aa	20.50±0.71Cbc	19.50±0.71Cc
Ampicillin (AMP)	25.75±0.35Ab	28.50±0.71ABa	22.00±0.00ABc	26.00±0.00Ab	25.75±0.35Ab
Nalidixic Acid (NA)	0.00±0.00H	0.00±0.00C	0.00±0.00E	0.00±0.00F	0.00±0.00E

Different uppercase letters indicate significant differences ($P<0.01$) among the antibiotics, while lowercase letters showed differences among the samples. Results are means (SD) of duplicate

As seen in Table 4, all of the *L. grayi* isolates (1, 6 and 30) showed the highest resistance to NA, while each of them had the highest susceptibility to the different antibiotics including AMP (isolate 1), TE (isolate 6) and CIP (isolate 30).

Currently, there is inadequate information about the antibiotic susceptibilities of *Listeria* spp. in cheeses. Some studies accorded that *L. monocytogenes* has become resistant to antimicrobial drugs currently in use for both human and veterinary medicine. Observing the *L. monocytogenes* isolates, the isolates of 38 and 47 had the highest resistance to TMP, SXT and NA. Also, all of the isolates showed highest susceptibility to the AMP. According to the Table 4. *L. grayi* and *L. monocytogenes* isolates showed statistically significant differences ($p<0.01$) in each other in terms of antibiotic susceptibility. Observing the statistical evaluations, the TMP, SXT and NA could be grouped together with respect to the effect on sample of 38 while, S, TMP, SXT and NA showed similar effect on sample 47. Also, TE, CN, C and K had similar effect on the samples of 38 and 47. Similar results were also reported by Pesavento et al. (2010) for *Listeria* spp. isolates were isolated from foods.

CONCLUSIONS

In conclusion, certain microbiological characteristics and antibiotic susceptibilities of *S. aureus*, *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. were revealed in 50 cheese samples. The obtained results indicated that some of the cheese samples were not suitable to standards with respect to the presence of pathogenic and other bacteria contents. Therefore, it can be said the use of stronger hygienic practices has high importance during cheese manufacturing, marketing and storage. Immunomagnetic separation (IMS) is accepted as an alternative method to the conventional method for the detection of *Salmonella* and *Listeria* due to rapid, sensitive and effective. The determined *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *L. grayi* isolates were analyzed in terms of their antibiotic susceptibilities and resistances. The results of the tests showed that the obtained isolates had quite significant antimicrobial resistance to antibiotics.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AKY and MY performed research. AKY analyzed data, and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

REFERENCES

- Abulreesh, H. H., 2012. *Salmonella* in the environment. In: *Annous, B., Gurtler, J.B., (Eds.), Salmonella distribution, adaptation, control measures and molecular Technologies*. 19-50, doi: 10.5772/28201
- Akçınar, H.Y., Aslim, B., Torul, H., Güven, B., Zengin, A., Suludere, Z., Boyacı, İ.H., Tamer, U. (2020). Immunomagnetic separation and *Listeria monocytogenes* detection with surface-enhanced Raman scattering. *Turk J Med Sci*, 50(4): 1157-1167
- Anonymous (2011). Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. 06 Şubat 2010 tarih 27133 sayılı Resmî Gazete, Ankara
- Anonymous (2014). XLD AGAR- For in vitro use only- Catalogue No. PX75. Original: Feb 2003. 2014; Revised / Reviewed: October 2014
- Arsalan, S., Ozdemir, F. (2008). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. *Food Control*, 19: 360-63, doi: 10.1016/j.foodcont.2007.04.009
- Ayaz, N.D., Erol, I. (2009). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ground Turkey by immunomagnetic separation and polymerase chain reaction. *J Rapid Meth Aut Mic*, 17: 214-222, doi: 10.1111/j.1745-4581.2009.00172.x
- Aygun, O., Aslantas, O., Oner, S. (2005). A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. *J Food Eng*, 66(3): 401-404
- BAM (2014). Bacteriological Analytical Manual, Chapter 5: *Salmonella*. Available at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> (accessed November 2, 2014)
- Bennett, R.W., Lancette G.A. (2012). *Staphylococcus aureus*. Chapter 12. In: FDA's bacteriological analytical manual. 8th ed. (Revision A). Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/webam/bam-12.html> (accessed May 28, 2012)
- Bi, Y., Shu, M., Zhong, C., Li, S.-Y., Li, Y.K., Yang, H.H., Wu, G.P. (2020). A novel SDS rinse and immunomagnetic beads separation combined with real-time loop-mediated isothermal amplification for rapid and sensitive detection of *Salmonella* in ready-to-eat duck meat. *Food Anal Meth*, 13: 1166-1175, doi.org/10.1007/s12161-020-01735-1
- Bingöl, K.K., Toğay, S.Ö. (2017). Urfa peynirlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında enterotoksin üretim potansiyeli ve metisilin dirençliliği. *Akademik gıda*, 15(1): 29-35
- Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C A., Franco, G.R., Rosa C.A. (2006). Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra Brazil. *World J Microbiol Biotechnol*, 22: 1115-1119, doi: 10.1007/s11274-006-9151-3
- Bouayad L, Hamdi T.M. (2012). Prevalence of *Listeria* spp. in ready to eat foods (RTE) from Algiers (Algeria). *Food Control*, 23(2): 397-99
- Briggiler-Marcó, M., Capra, M.L., Quiberoni, A., Vinderola, G., Reinheimer, J.A., Hynes, E. (2007). Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: *in vitro* characterization and performance in two model cheeses. *J Dairy Sci*, 90: 4532-4542, doi: 10.3168/jds.2007-0180
- Brooks, J.C., Martinez, B., Stratton, A., Bianchini, A., Krokstrom, R., Hutkins, R. (2012). Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence foodborne pathogens. *Food Microbiol*, 31(2): 154-158
- CLSI (2014). 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, USA
- Colak, H., Hampikyan, H., Bingol, E.B., Ulusoy, B. (2007). Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in tulum cheese. *Food Control*, 18(5): 576-579
- Dave, R.I., Shah, N.P. (1998). Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *J Dairy Sci*, 81: 2804-2816, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75839-4

- Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Mol Biol Rev*, 55(3): 476-511
- Gülmez M., Güven A. (2001). Beyaz ve çeçil peynirlerinde *Campylobacter*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinin araştırılması. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 7: 155-161
- Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Methods in Food Microbiology*, Academic Press, San Diego, USA
- Hayaloglu, A.A., Guven, M., Fox, P.F. (2002). Microbiological, biochemical and technological properties of Turkish White cheese "Beyaz Peynir". *Int Dairy J*, 12: 635-648, doi: 10.1016/S0958-6946(02)00055-9
- Herrera A.G. (2001). Yeasts and Molds. In: *Food Microbiology Protocols. Methods in Biotechnology*, Spencer, J.F.T., de Ragout Spencer A.L. (eds), Volume 14. Humana Press, the UK, pp. 27-28. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:27>
- Hitchins, A.D., Jinneman, K., Chen, Y. (2016). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. USA Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual
- Hossein, M., Hadis, M., Tahere, S. (2010). Determining of antibiotic resistance profile in *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pac J Trop Dis*, 3: 734-737, doi: 10.1016/S1995-7645(10)60176-9
- ISO (2002). *Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* Geneva, Switzerland
- Kanbakan, U., Con, A.H., Ayar, A. (2004). Determination of microbiological contamination sources during ice cream production in Denizli, Turkey. *Food Control*, 15: 463-470, doi: 10.1016/S0956-7135(03)00131-2
- 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 Safety*, 35(3): 385-394, doi: 10.1111/jfs.12186
- Kızanlık, P.K., Göksoy, E.Ö. (2018). Microbiological quality evaluation of various types of cheese. *Erişyes Üniv Vet Fak Derg*, 15(2): 86-93
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet and Mol Res*, 2(1): 63-76
- Lynch, M.J., Leon-Velarde, C.G., McEwen, S., Odumeru, J.A. (2004). Evaluation of an automated immunomagnetic separation method for the rapid detection of *Salmonella* species in poultry environmental samples. *J Microbiol Methods*, 58: 285-288, doi: 10.1016/j.mimet.2004.04.005
- Maturin, L.J., Peeler, J.T. (1998). Aerobic Plate Count, Chapter 3, Bacteriological analytical manual (BAM 8th edition), FDA, Gaitghersburg, MD, USA
- Mccabe-Sellers, B.J., Beattie, S.E. (2004). Emerging trends in food borne illness surveillance and prevention. *J Am Diet Assoc*, 104: 1708-1717, doi: 10.1016/j.jada.2004.08.028
- Öksüztepe, G., Patır, B., Dikici, A., İlhak, I. (2009). Elazığ'da tüketime sunulan vakum paketlenmiş kaşar peynirlerinin mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 23(2): 89-94
- Özer, B., Yaman, H. (2014). Milk and Milk Products. Microbiology of Liquid Milk. In: *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Carl, A., Batt, Mary Lou Tortorello (eds.), Academic Press, pp. 721-727. doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00219-6
- Pamuk, Ş., Sırıken, B. (2018). Investigation of the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in bovine origin foods. *Erişyes Üniv Vet Fak Derg*, 15(1): 22-29
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., Lo Nostro, A. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, 21: 708-713, doi: 10.1016/j.foodcont.2009.10.012
- Ponce, E., Khan, A.A., Cheng, C.M., Summage, W.C., Cerniglia, C.E. (2008). Prevalence and characterization of *Salmonella* enteric serovar Weltevreden from imported sea food. *Food*

- Microbiol*, 25: 29-35, doi: 10.1016/j.fm.2007.09.001
- Rambach, A. (1990). New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 56: 301-303
- Reij, M.V., Den Antraker, E.D., ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int J Food Microbiol*, 91: 1-11, doi: 10.1016/S0168-1605(03)00295-2
- Rippey, S.R., Adams, W.N., Watkins, W.D. (1987). Enumeration of fecal coliforms and *E. coli* in marine and estuarine waters: an alternative to the APHA-MPN approach. *J Water Pollut Control Fed*, 59: 795-798
- Saadat, Y.R., Fooladi, A.A.I., Shapouri, R., Hosseini, M.M., Khiabani, Z.D. (2014). Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. *Iran J Microbiol*, 6: 345-349
- Sağun, E., Sancak, Y.C., İşleyici, Ö., Ekici, K. (2001). Van ve çevresi süt ve otlu peynirlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı üzerine bir araştırma. *Turk J Vet Anim Sci*, 25(1): 15-19
- Tekinşen, K.K., Özdemir, Z. (2006). Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. *Food Control*, 17(9): 707-711
- Uyttendaele, M., Van Hoorde, I., Debevere, J. (2000). The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese. *Int J Food Microbiol*, 54(3): 205-212, doi: 10.1016/S0168-1605(99)00196-8

KOAGÜLAZ-NEGATİF *STAPHYLOCOCCUS* (KNS) VE *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA ÖZELLİKLERİNİN VE ADEZYON FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

Gaye Asuman Yerli, Banu Özden Tuncer**

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

Geliş / Received: 03.09.2020; Kabul / Accepted: 16.03.2021; Online baskı / Published online: 25.03.2021

Yerli, G.A., Özden Tuncer, B. (2021). Koagülaz-negatif *Staphylococcus* (KNS) ve *Macrocooccus caseolyticus* suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin ve adezyon faktörlerinin araştırılması. GIDA (2021) 46 (3) 500-514 doi: 10.15237/gida. GD20099

Yerli, G.A., Özden Tuncer, B. (2021). Investigation of biofilm formation properties and adhesion factors of coagulase-negative *Staphylococcus* and *Macrocooccus caseolyticus* strains. GIDA (2021) 46 (3) 500-514 doi: 10.15237/gida. GD20099

ÖZ

Bu çalışmada geleneksel fermente Türk sucuklarından izole edilmiş toplam 50 adet koagülaz-negatif *Staphylococcus* (KNS) ve 10 adet *Macrocooccus caseolyticus* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri fenotipik olarak belirlenmiş ve aynı zamanda suşlarda biyofilm oluşumu ile ilişkili genler ve adezyon genlerinin varlığı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mPZR) ile araştırılmıştır. Fenotipik olarak slaym (slime) üretimi Congo Red agar (CRA), biyofilm üretim düzeyi mikrotitre plaka yöntemi ile belirlenmiştir. CRA besiyerinde slaym üreticisi olduğu belirlenen 33 suşun tamamının mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının 28'inin orta, 23'ünün zayıf ve 1'nin güçlü biyofilm üreticisi olduğu saptanmıştır. Sekiz suşa ise biyofilm üretiminin olmadığı tespit edilmiştir. mPZR denemeleri sonucu biyofilm üreticisi olduğu belirlenen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının %84.62'sinin araştırılan genlerden en az birini içerdiği bulunmuştur. Suşların %66.67'sinde *eno* geni, %15.67'sinde *icaA* geni varlığı belirlenmiştir. Diğer taraftan biyofilm üreticisi olduğu belirlenen 8 suşun ise çalışma kapsamında araştırılan biyofilm genlerinin hiçbirini içermediği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sucuk, koagülaz-negatif *Staphylococcus*, Biyofilm, Adezyon faktörler

INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION PROPERTIES AND ADHESION FACTORS OF COAGULASE-NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS* AND *MACROCOCCUS CASEOLYTICUS* STRAINS

ABSTRACT

In this study, biofilm forming properties of 50 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) and 10 *Macrocooccus caseolyticus* strains isolated from traditional fermented Turkish sausages (sucuk) were

* Bu araştırma Gaye Asuman YERLİ'nin yüksek lisans tez çalışmasıdır. Bu çalışma 9. Gıda Mühendisliği Kongresi İzmir/Türkiye'de poster olarak sunulmuş ve kongre kitabında özet olarak basılmıştır. *This paper is MSc thesis of Gaye Asuman YERLİ. This study was presented as a poster presentation at the 9th Food Engineering Congress İzmir/Turkey, and study was published as a abstract in the book of proceedings.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ banutuncer@sdu.edu.tr

☎ (+90) 246 211 8006

☎ (+90) 246 237 0437

Gaye Asuman Yerli; ORCID no: 0000-0003-4586-9343

Banu Özden Tuncer; ORCID no: 0000-0001-9678-4441

phenotypically determined and also the presence of genes associated with biofilm formation and adhesion genes in the strains was investigated by multiplex polymerase chain reaction (mPZR). Slime production was determined on Congo Red agar (CRA) by phenotypically and biofilm production level was determined by microtiter plate method. All 33 strains determined to be slime producers in CRA medium were determined to be biofilm producers by microtiter plate method. It has been determined that 28 of KNS and *M. caseolyticus* strains are medium, 23 are weak and 1 is strong biofilm producers. Biofilm production was not detected in eight strains. As a result of mPZR experiments, 84.62 % of CNS and *M. caseolyticus* strains determined to be biofilm producers were found to be contain at least one of the genes investigated. *eno* gene was detected in 66.67% of the strains and the presence of *icaA* gene in 15.67% of the strains. On the other hand, it was determined that 8 strains determined to be biofilm producers do not contain any of the biofilm genes investigated within the scope of the study.

Key words: Sucuk, Coagulase-negative *Staphylococcus*, Biofilm, Adhesion Factors

GİRİŞ

Staphylococcus cinsine ait bazı üyeler insan ve hayvan patojeni olarak bilinmektedir. Bu grup bakteriler kan hücrelerinde gösterdikleri reaksiyona göre koagülaz-pozitif ve koagülaz-negatif stafilokoklar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birçok bakteri tarafından üretilen koagülaz enzimi kan içerisinde yer alan fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlayarak kanın pıhtılaşmasına neden olmaktadır. Patojen *S. aureus* suşlarının birçoğu koagülaz-pozitif olmasına rağmen bazı doğal stafilokok suşları koagülaz reaksiyonu göstermezler. KNS'ların çoğu doğada, insan ve hayvan mukoz membranlarında sıkça bulunmakla birlikte fırsatçı patojen olarak tanınmakta ve bakteremi, septisemi, endokardit, idrar yolu enfeksiyonu ve şant enfeksiyonu gibi birçok enfeksiyona sebep olabilmektedir (Kloos vd., 1994; Piette ve Verschraegen, 2008; Rogers vd., 2009).

Stafilokokların *in vivo* katı yüzeylere tutunma ve hücre tabakalarından oluşan biyofilm oluşturma özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Biyofilmler, mikroorganizmaların yüzeylere tutunarak çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleri sonucu oluşur. KNS'ların etken olduğu enfeksiyonlar genellikle biomateriyaller üzerinde biyofilm tabakası oluşması sonucu gerçekleşir. Biyofilm oluşturan KNS'lar mikrobiyel topluluklar şeklinde yaşamakta ve gıda ile temas eden ekipmanlar üzerinde sanitizerlere direnç göstererek kontaminasyon kaynağı oluşturabilmektedir. Açık yüzeylerden sürüntü alarak biyofilm oluşumu tespit edilebilse de boru içleri gibi kapalı ekipmanlarda biyofilm

oluşumlarını belirlemek oldukça güçtür. Yüzeylerde biyofilm oluşturarak yaşam sürdüren bakteriler, aynı türün bireysel formlarına göre dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. Bu nedenle geleneksel temizlik ve dezenfektan uygulamaları bu bakterileri öldürmek için yetersiz kalabilmektedir. Aynı zamanda biyofilm içerisinde fiziksel temas halinde bulunan bakteriler biyofilm oluşturma yeteneklerini konjugasyon aracılığı ile aktarabilmektedir. Biyofilmler bu bağlamda virülens ve direnç determinantlarının mikroorganizmalar arasında aktarımının sağlandığı ortam şartlarını da oluşturmaktadır (Schlegelova vd., 2010).

Tıbbi araç-gereç ve implantlarda özellikle *S. epidermidis* ve *S. aureus* kaynaklı biyofilm oluşumları oldukça sık araştırılmaktadır. Ancak literatürde çeşitli gıda örnekleri ve gıda ile ilişkili yüzey ve ekipmanlarda bulunabilecek biyofilm oluşturma yeteneğindeki stafilokok türleri üzerinde yeterince bilgi yer almamaktadır. Türler arasında değişiklik göstermesine rağmen *S. sciuri* ve *S. xylosus* susuz yüzeylerde biyofilm oluşturabilmekte *S. carnosus* ise çeşitli yüzeylerde varlık gösterebilmektedir. Söz konusu bakterilerin gıda ile ilişkili susuz yüzeylere tutunabilme ve biyofilm oluşturma yeteneği kolonizasyon şansını artırmakta ve gıda zehirlenmelerine zemin hazırlamaktadır (Planchon vd., 2007; Brooks ve Flint, 2008).

Laktik asit bakterileri ve KNS'lar sucuk gibi et fermentasyon ürünlerinin üretiminde yer alan başlıca bakteri gruplarıdır. KNS suşlarının doğal yaşam alanları insan ve hayvanların deri ve mukozaları olduğu için bu suşlar hayvansal

kaynaklı çeşitli gıdalardan izole edilebilmektedir. Farklı çalışmalarda çeşitli fermente et ürünlerinden izole edilen KNS türleri arasında yaygın olarak *S. xylosus*, *S. equorum* ve *S. saprophyticus* türlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca farklı çalışmalarda fermente sosislerden önceden *Staphylococcus caseolyticus* olarak adlandırılmış olan *Macrococcus caseolyticus* suşlarının da izole edildiği belirtilmiştir (Kaban ve Kaya, 2008; Leroy vd., 2010; Talon ve Leroy, 2011; Busconi vd., 2014; Kesmen vd., 2014; Geniş ve Tuncer, 2018). Makrokoklar farklı memelilerin cilt yüzeylerinde ve çiğ süt, pastörize süt, süt ürünleri, et ve et ürünleri gibi gıdalarda da bulunabilmektedir. Makrokoklar insan enfeksiyonları ile doğrudan ilişkili olmasalar da, hayvanlarda enfeksiyonlara yol açan patojenler olarak rolleri son yıllarda giderek daha fazla araştırılmaktadır. *M. caseolyticus* ve *M. canis* koyun, sığır ve köpeklerde apse, mastitis, otitis ve dermatit gibi enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen makrokok türleridir. Diğer taraftan *M. caseolyticus* lipolitik ve proteolitik aktiviteleri nedeniyle gıda fermentasyonlarında kullanılabilir (Ramos vd., 2021).

Biyofilm oluşumu, biyofilmin yapışmasını, birikmesini, olgunlaşmasını ve dağılmasını içeren çok aşamalı bir süreçtir. Biyofilm oluşum kapasitesi birçok genetik faktör tarafından belirlenir. Ana biyofilm bileşeni, *icaABCD* operonunu oluşturan *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD* genleri tarafından kodlanan enzimler tarafından sentezlenen polisakarit hücrelerarası adhezin (PIA) molekülüdür (Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020). *bap* geni tarafından kodlanan biyofilm ile ilişkili *bap* proteini suşların hem abiyotik yüzeylere ilk tutunmasını hem de hücreler arası tutunmayı desteklemektedir (Cucarella vd., 2001; Simojoki vd., 2012). Stafilkoklara ait bir protein ailesi olan MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Matrix Molecules, Matris Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyel Yüzey Bileşenleri) bakterinin yüzeylere tutunması ve konak hücre içine invase olması (girişi) ile ilişkilidir (Los vd., 2010; Simojoki vd., 2012, Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020).

MSCRAMM içerdiği, *fmbA* ve *fmbB* tarafından kodlanan fibronektin bağlayıcı protein A ve B, *clfA* ve *clfB* tarafından kodlanan fibrinojen bağlayıcı proteinler kümelenme faktörü A ve B, *cna* tarafından kodlanan kolajen bağlayıcı protein ve *fib* tarafından kodlanan fibrinojen bağlayıcı proteinler ile hücre dışı memeli proteinleri ve abiyotik yüzeylere tutunmayı sağlar. Koagülaz-pozitif ve koagülaz-negatif stafilkokların çeşitli yüzeylere tutunma kabiliyeti, laminin bağlayıcı proteini kodlayan *eno* geni tarafından da belirlenmektedir (Kong vd., 2018).

Biyofilm oluşturma kapasitesi, stafilkok virülansının en önemli faktörlerinden biridir. Fermente et ürünlerinde biyofilm oluşturan stafilkokların oluşması, et işleme tesislerinde teknolojik süreçlerde bozulmalara ve son ürünün kontaminasyonuna neden olabilir. Bu nedenle, bu çalışmada sucuktan izole edilmiş KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında biyofilm oluşumunun prevalansını ve özelliklerini belirlemeyi ve bu izolatlarda biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda geleneksel fermente Türk sucuklarından izole edilmiş 50 adet KNS ve 10 adet *M. caseolyticus* suşlarında biyofilm oluşturma özellikleri fenotipik olarak belirlenmiş ve suşların biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerinin (*icaA*, *icaB* ve *bap*) yanında adezyon genlerinin de (*fmbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *eno*, *ebpS*, *bbp* ve *fmbA*) varlığı mPZR ile araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Mikroorganizma

Çalışma kapsamında Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel Genetik Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanan, Afyonkarahisar ilinden temin edilen starter kültür kullanılmadan üretilmiş olan fermente Türk sucuklarından izole edilmiş ve 16S rDNA dizi analizi yöntemi ile moleküler düzeyde tanıları yapılmış olan 50 adet KNS (21 *S. saprophyticus*, 16 *S. epidermidis*, 4 *S. xylosus*, 3 *S. scuri*, 2 *S. hominis*, 2 *S. warneri*, 1 *S. cohnii*, 1 *S. pasteurii*, 1 *S. vitulinus*) ve 10 adet *Macrococcus* suşları kullanılmıştır (Geniş ve Tuncer, 2018).

Slaym oluşturma yeteneğinin Congo Red Agar yöntemi ile belirlenmesi

KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının slaym oluşturma özellikleri Congo Red Agar (CRA, 0.8 g/L congo red, 50 g/L sakaroz, 37 g/L Brain Heart Infusion broth, 10 g/L agar agar) ortamlarında fenotipik olarak incelenmiştir. Tryptone Soy Broth (TSB, LAB M Ltd., İngiltere) besiyerinde geliştirilen suşlar CRA besiyerine sürme yöntemi ile ekilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan kolonilerin renkleri incelenerek fenotipik olarak slaym oluşturma yetenekleri belirlenmiştir. CRA besiyeri ortamında siyah renkli koloniler slaym pozitif, pembe renkli koloniler slaym negatif olarak değerlendirilmiştir (Freeman vd., 1989).

Biyofilm üretiminin mikrotitre plaka yöntemi ile belirlenmesi

KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının biyofilm üretiminin belirlenmesinde 96 kuyulu mikrotitre plakalar (V plate, LP Italiana Spa, İtalya) kullanılmıştır. Biyofilm üretimi Toledo Arana vd. (2001) tarafından önerilen yöntemde küçük modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Aktif KNS ve *M. caseolyticus* suşları %0.25 (w/v) glukoz içeren TSB besiyerinde 1:100 oranında dilüe edilmiş ve mikrotitre plakalara 200 µL aktararak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plakalar fosfat tampon (PBS, pH 7.4) ile mikropilaka yıkayıcı (Biotek ELx50, Vermont ABD) kullanılarak 3 kez yıkanmıştır. Plakalar 60 °C'de 1 saat kurutulmuştur. Daha sonra plakalar kristal viyole (%1, w/v) ile 15 dakika boyanmış ve tekrar yıkanmıştır. Plakalar 200 µL etanol/aseton (80:20, v/v) ile doldurulmuş ve biyofilm optik yoğunluğu (OD) 570 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu (Biotek Synergy HT, Vermont ABD) ile ölçülmüştür. Biyofilm üretim düzeyi Stepanović vd. (2007)'ye göre aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirilmiştir. ODc eşik değer optik yoğunluğunu, ODnc negatif kontrolün optik yoğunluğunu ve SDnc ise negatif kontrolün standart sapmasını ifade etmektedir. Suşlar; biyofilm üreticisi değil ($OD \leq ODc$), zayıf biyofil üreticisi ($ODc < OD \leq 2x ODc$), orta düzeyde biyofilm üreticisi ($2x ODc < OD \leq 4x ODc$) ve

güçlü biyofilm üreticisi ($4x ODc < OD$) olarak değerlendirilmiştir.

$$ODc = \text{ortalama } ODnc + (3 \times SDnc) \quad (1)$$

Genomik DNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi

TSB besiyerinde 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakılarak aktive edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarından Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemle göre genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen genomik DNA'nın varlığı %0.7 (w/v) agaroz (AppliChem, Darmstadt, Almanya) oranı ile hazırlanan jellerde (Thermo OWL EASYCAST B2, Litvanya) tespit edilmiştir. Etidyum bromit (0.2 µg/mL) ile boyanan agaroz jellerin fotoğrafları Nikon D-5100 (Nikon Co., Japonya) fotoğraf makinesi ile çekilmiştir.

Biyofilm üretiminin mPZR ile genotipik tanısı

Çalışma kapsamında *fnbA* ve *fnbB* (fibronektin bağlayıcı protein A ve B), *fib* (fibrinojen bağlayıcı protein), *clfA* ve *clfB* (kümeleme faktörü A ve B), *cna* (kollejen bağlayıcı protein) *eno* (laminin bağlayıcı protein), *ebpS* (elastin bağlayıcı protein), *bbp* (kemik sialoprotein bağlayıcı protein), *icaA* ve *icaD* (hücreler arası adezin A ve D) ve *bap* (biyofilm ile ilişkili protein) genlerinin varlığı Phusion Flash High Fidelity PCR Master Mix (Thermo #F-548L, Litvanya) kullanılarak mPZR yöntemi ile Techne TC3000 (Cambridge, İngiltere) cihazı ile araştırılmıştır. mPZR denemelerinde varlığı araştırılan genlerin ampikon büyüklükleri ve bu genlere özgü primerlerin bağlanma sıcaklıkları dikkate alınarak 2 ayrı primer takımı oluşturulmuş (Primer takımı 1: *fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *bbp*, *icaA* ve *icaD*; primer takımı 2: *cna*, *eno*, *bap*) ve 25 döngü olacak şekilde iki farklı PZR koşulu uygulanmıştır. *fnbA* geninin varlığı ise PCR Master Mix (Thermo #K0172, Litvanya) kullanılarak tekli PZR uygulaması ile araştırılmıştır. Denemelerde varlığı araştırılan genler ile kullanılan primerler, ampikon büyüklükleri ve PZR koşulları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. mPZR çalışmalarında araştırılan genler, primerler, PZR protokolleri ve amplicon büyüklükleri

Table 1. Genes researched in mPCR studies, primers, PCR protocols and amplicon sizes.

Gen Gene	Primer sekansı (5'-3') Primer sequence (5'-3')	PZR protokolü PCR protocol	Ürün büyüklüğü (bp) Amplicon size (bp)
<i>hap</i>	3'-CCCTATATCGAAGGTGTAGAAAT-5' 5'-GCTGTTGAAGTTAATACTGTACCTGC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 57 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 1 dk/min (1 döngü / cycle)	971 ^a
<i>bbp</i>	3'-AACTACATCTAGTACTCAACAACAG-5' 5'-ATGTGCTTGAATAACACCATCATCT-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	575 ^b
<i>clfA</i>	3'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-5' 5'-CGTTTCTTCCGTAGTTGCATTTG-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	292 ^b
<i>clfB</i>	3'-ACATCAGTAATAGTAGGGGGCAAC-5' 5'-TTCGCACTGTTTGTGTTTGCAC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	205 ^b
<i>cna</i>	3'-GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC-5' 5'-AATCAGTAAITGCACITTTGTCCACTG-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 57 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 1 dk/min (1 döngü / cycle)	423 ^b
<i>ebpS</i>	3'-GTCAAGCAGTTATTAACACCAGAC-5' 5'-AATCAGTAAITGCACITTTGTCCACTG-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	423 ^b
<i>eno</i>	3'-ACGTGCAGCAGCTGACT-5' 5'-CAACAGCATCTTCAGTACCTTC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 57 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 1 dk/min (1 döngü / cycle)	302 ^b
<i>fjb</i>	3'-CTACAACFACAAITGCCGTCAACAG-5' 5'-GCTCTTGTAAGACCAITTTCTTCAC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	404 ^b
<i>fjbA</i>	3'-GTGAAGTTTTAGAAAGGTGGAAAGATTAG-5' 5'-GCTCTTGTAAGACCAITTTCTTCAC-3'	94 °C 6 dk/min (1 döngü / cycle); 94 °C 1 dk/min, 52 °C 1 dk/min, 72 °C 1 dk/min (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	643 ^b
<i>fjbB</i>	3'-GTAACAGCTAATGGTTCGAATTGATACT-5' 5'-CAAGTTCGATAGGAGTACTATGTTTC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	524 ^b
<i>icaA</i>	3'-CCTAACTAACGAAAAGGTAG-5' 5'-AAGATATAGCGATAAGTGC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	1315 ^c
<i>icaD</i>	3'-AAACGTAAGAGAGGTGG-5' 5'-GGCAATATGATCAAGATAC-3'	98 °C 10 s/sec (1 döngü / cycle); 98 °C 1 s/sec, 55 °C 1 dk/min, 72 °C 90 sn/sec (25 döngü / cycles); 72 °C 10 dk/min (1 döngü / cycle)	381 ^c

^a Seo vd. 2008^b Vasudevan vd. 2003^c Tristan vd. 2003

PZR denemeleri sonucunda çoğaltılan genlerin agaroz jel elektroforezleri %1.5 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde Thermo OWL EASYCAST B2 cihazı kullanılarak yapılmıştır. Elektroforez işleminin ardından tanktan çıkarılan jeller elektroforez tamponununun 0.2 µg/mL etidyum bromit içeren çözeltisinde 30 dk süre ile boyamaya bırakılmıştır. Boyama işlemi sonrasında jeller UV ışık altında incelenmiş ve Nikon D-5100 dijital fotoğraf makinası kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmada CRA besiyeri kullanılarak fenotipik olarak slaym oluşumunun test edildiği ilk denemede 60 izolatın 13'ünün (%21.66) siyah, 15'inin (%25.00) zayıf-siyah ve 32'sinin (%53.33) ise pembe koloni oluşturduğu gözlemlenmiştir. İkinci denemede ise izolatların 12'sinin (%20.00) siyah, 9'unun (%15.00) zayıf-siyah ve 39'unun (%65.00) ise pembe koloni oluşturduğu belirlenmiştir (Veri gösterilmedi). Zhou vd. (2013), kateter ve kan izolatu olan KNS suşlarının 3 ile 5 jenerasyon sonrasında siyah koloni yapısından bordo ve pembe koloni yapısına kadar değişim gösterdiğini belirlenmişlerdir. Araştırmacılar koloni rengindeki bu değişimin biyofilm oluşumu için *in vivo* ve *in vitro* koşullar arasındaki besin bileşenleri, pH, oksijen radikalleri ve antibiyotikler gibi farklı çevresel koşulların yarattığı pozitif seçici ortam varlığı veya biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu kesin bilinen *icaA* ve *icaD* genlerinin kaybı ya da mutasyonu sonucu olduğu hipotezini öne sürmüşlerdir. Mevcut çalışma kapsamında da farklı zamanlarda CRA besiyerinde slaym oluşumları test edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının farklı fenotipik sonuçlar vermesinin nedeni izolatların her bir denemeden önce de aktifleştirilmek için iki kez pasajlanmış olmaları olabilir. Simojoki vd. (2012), CRA besiyerinde siyah veya siyaha yakın kolonilerin slaym üreticisi olduklarını bildirmiştir. Bu bağlamda CRA besiyeri kullanılarak yapılan denemelerden herhangi birinde zayıf siyah veya siyah koloni rengi veren 33 (%55) suş slaym üreticisi olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 2).

Mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üretim yetenekleri araştırılan KNS ve *M. caseolyticus*

suşlarının 28'inin (%46.67) orta, 23'ünün (%38.33) zayıf ve 1'nin (1.67) güçlü biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Sekiz suşta (%13.33) ise biyofilm üretiminin olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 2). CRA besiyerinde slaym üreticisi olduğu belirlenen 33 suşun tamamının mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan CRA besiyerinde slaym üretmediği belirlenen 23 suşun zayıf veya orta düzeyde biyofilm üreticisi olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak Gajewska ve Chajęcka-Wierczkowska (2020) CRA besiyerinde slaym üreten veya üretmeyen *S. aureus* ve KNS suşlarının mikrotitre plaka yöntemi ile güçlü biyofilm üreticisi olarak belirlendiklerini bildirmişlerdir.

Stafilokok izolatlarının biyofilm oluşturabilme özelliklerinin incelenmesinde fenotipik değerlendirme yöntemlerinin yanı sıra genotipik çalışmaların da uygulanması önemlidir (Vasudevan vd., 2002). Bu bağlamda fenotipik olarak biyofilm oluşturma özellikleri belirlenen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında biyofilm ve adezyon genlerinin varlığı araştırılmıştır. Biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının %84.62'sinin araştırılan genlerden en az birini içerdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan biyofilm üreticisi 8 suşun ise çalışma kapsamında araştırılan biyofilm genlerinin hiçbirini içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 3). Benzer olarak Gajewska ve Chajęcka-Wierczkowska (2020) *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xylosus* ve *S. simulans* türleri üyesi güçlü biyofilm üreticisi 5 KNS suşunun hiçbirinde biyofilm üretimi ile ilişkili gen tespit etmemişlerdir. Farklı çalışmalarda belirtildiği gibi, biyofilm genlerinin başarısız amplifikasyonu biyofilm ile ilişkili genlerde meydana gelebilen mutasyonlara bağlı olarak DNA dizilerindeki farklılıklardan kaynaklı olabilir (Oliveira vd. 2006; Darwish ve Asfour 2013; Melo vd., 2013).

Çizelge 2. KNS ve *M. caseolyticus* suşlarının CRA besiyerinde slaym üretimi ve mikrotitre plaka yöntemi ile biyofilm üretimiTable 2. Slime production of CNS and *M. caseolyticus* strains on CRA media and biofilm production by microtiter plate method.

Suşlar Strains	CRA Besiyerinde Slaym Üretimi Slime Production on CRA Media	Biyofilm Üretimi (Mikrotitre Yöntemi)* Biofilm Production (Microtiter Plate Method)*
<i>S. saprophyticus</i> BYS1	+	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS2	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS4	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS5	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS7	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS8	+	Orta
<i>S. cohnii</i> BYS9	-	Orta
<i>S. sciuri</i> BYS10	+	Güçlü
<i>S. saprophyticus</i> BYS11	-	Zayıf
<i>S. vitulinus</i> BYS12	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS13	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS14	-	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS15	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS16	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS17	-	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS18	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS19	+	Zayıf
<i>S. sciuri</i> BYS20	-	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS21	+	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS22	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS23	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS24	-	Zayıf
<i>S. hominis</i> BYS27	+	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS28	-	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS29	+	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS30	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS32	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS34	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS35	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS36	+	Orta
<i>S. xylosum</i> BYS37	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS39	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS40	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS41	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS42	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS43	-	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS44	-	Zayıf
<i>S. sciuri</i> BYS45	+	Orta
<i>S. epidermidis</i> BYS46	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS47	-	Zayıf
<i>S. warneri</i> BYS48	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS49	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS50	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS51	+	Orta
<i>M. caseolyticus</i> BYS52	+	Orta
<i>S. warneri</i> BYS53	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS54	-	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS55	+	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS56	-	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS57	+	Orta
<i>S. hominis</i> BYS58	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS59	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS60	-	Zayıf
<i>S. epidermidis</i> BYS61	-	-
<i>S. pasteurii</i> BYS62	+	Zayıf
<i>M. caseolyticus</i> BYS63	+	Orta
<i>S. saprophyticus</i> BYS64	-	Zayıf
<i>S. saprophyticus</i> BYS65	+	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS66	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS67	-	Zayıf

* Zayıf/weak, orta/moderate, güçlü/strong

Çizelge 3. KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında saptanan biyofilm oluşumu ve adezyon genleri
 Table 3. *Biofilm formation and adhesion genes determined in CNS and M. caseolyticus strains.*

Suşlar Strains	Biyofilm Oluşumu ile İlişkili Genler / <i>Biofilm Associated Genes</i>			Adezyon Genleri / <i>Adhesion Genes</i>								
	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>bap</i>	<i>fnbA</i>	<i>fnbB</i>	<i>fib</i>	<i>clfA</i>	<i>clfB</i>	<i>cna</i>	<i>eno</i>	<i>ebpS</i>	<i>bbp</i>
<i>S. saprophyticus</i> BYS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. cohnii</i> BYS9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. sciuri</i> BYS10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. vitulinus</i> BYS12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. sciuri</i> BYS20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. hominis</i> BYS27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> BYS37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS43	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS44	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sciuri</i> BYS45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS46	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS47	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. warneri</i> BYS48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. warneri</i> BYS53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. hominis</i> BYS58	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> BYS61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pasteurii</i> BYS62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS64	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>S. saprophyticus</i> BYS66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>M. caseolyticus</i> BYS67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Çalışma kapsamında araştırılan biyofilm ve adezyon genlerinden KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında en sık rastlanan genin *eno* geni olduğu tespit edilmiştir. Adezyon genlerinden biri olan *eno* geni *M. caseolyticus* suşlarının tamamında (%100), KNS suşlarının ise %66.67'sinde tespit edilmiştir (Şekil 1). Söz konusu çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da *eno* geninin adezyon genleri arasında en sık rastlanan gen olduğu bildirilmiştir (Seo vd., 2008; Simojoki vd., 2012; Darwish ve Asfour, 2013; Azara vd., 2017; Srednik vd., 2017; Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020). Seo vd. (2008), hayvan (36) ve havadan (35) izole ettikleri *Staphylococcus* spp. izolatlarında biyofilm oluşumu ile ilişkili fenotipik ve genotipik karakteristiklerin araştırıldığı çalışmalarında en sık rastlanan genin *eno* geni olduğunu tespit etmişlerdir. Havadan izole edilen suşların %83'ü, hayvansal izolatların ise %53'ünün *eno* geni içerdiği bildirilmiştir. Simojoki vd. (2012), 192 adedi mastitisli sığır sütü örneklerinden izole edilen ve 52 adedi referans KNS suşu olmak üzere toplam 244 adet KNS suşunda 9 adezyon geni (*fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *eno*, *ebpS*, *bbp* ve *fnbA*) ve 3 biyofilm oluşumu ile ilişkili genin (*icaA*, *icaD* ve *bap*) varlığını araştırdıkları çalışmalarında mastitisli süt örneklerinden izole edilen 192 adet izolatın %75'inde ve 52 adet referans suşun %79.6'sında *eno* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada mastitisli sütlerden izole edilen *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus* izolatlarının tamamının *eno* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Mevcut çalışmada ise *S. epidermidis* izolatlarının %40'ının *eno* geni içerdiği belirlenmiştir. Darwish ve Asfour (2013), mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 40 adet *S. aureus* ve 68 adet KNS izolatının biyofilm oluşturma yetenekleri ve biyofilm ilişkili genlerin (*icaA*, *icaD*, *bap* ve *eno*) varlığını araştırdıkları çalışmalarında *S. aureus* izolatlarının %75'inde, KNS izolatlarının ise %92.6'sında *eno* geni tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bizim çalışmamıza benzer olarak *eno* geninin *icaA*, *icaD* ve *bap* gibi biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu bilinen genlere oranla daha sık görüldüğünü rapor etmişlerdir. Azara vd. (2017), Sardunya/İtalya'da klinik koyun mastitis örneklerinden izole ettikleri 258 *S. aureus* suşunun 228 adedinin (%88.7) *eno* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Srednik vd.

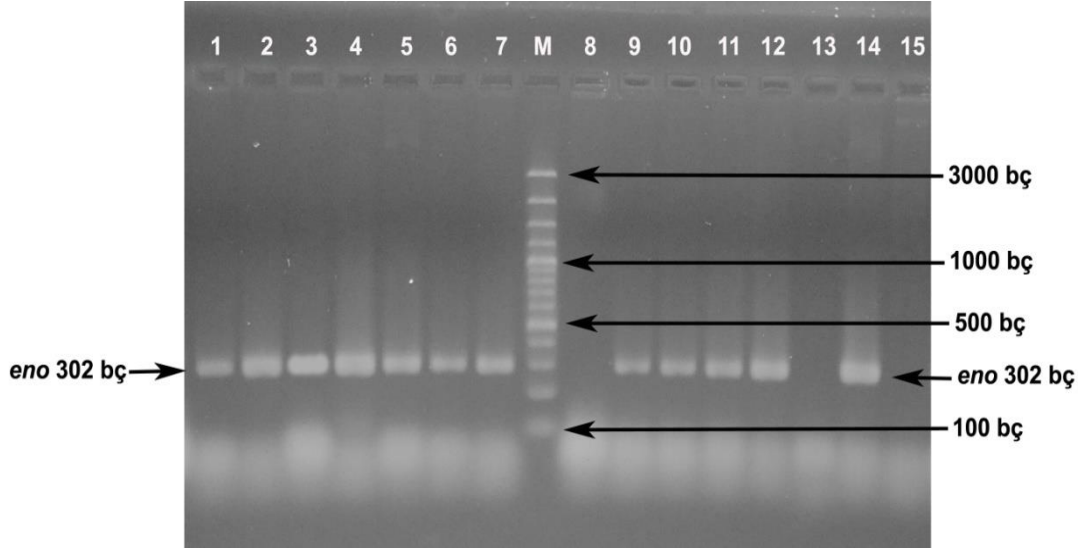
(2017) yaptıkları bir çalışmada, süt kaynaklı 90 adet KNS izolatında araştırılan 7 biyofilm oluşumu ile ilişkili gen (*icaA*, *bap*, *aap*, *fbe*, *atlE*, *embP* ve *eno*) arasında en sık rastlanan genin %87.7 ile *eno* geni olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar *eno* geninin türden ve biyofilm oluşturma yeteneğinden bağımsız olarak gıda kaynaklı KNS suşlarında oldukça yaygın olarak bulunduğunu bildirmiştir. Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska (2020), 12 *S. aureus* ve 42 KNS suşlarında %50 ile en sık rastlanan genin *eno* geni olduğunu rapor etmişlerdir.

Araştırma kapsamında sucuktan izole edilen KNS ve *M. caseolyticus* suşları arasında *eno* geninden sonra en sık tespit edilen genin *icaA* geni olduğu belirlenmiştir. *icaA* geni KNS suşlarının %15.69'unda tespit edilirken, *M. caseolyticus* suşlarının hiçbirinde tespit edilmemiştir. *S. xylosus* BYS14, *S. epidermidis* BYS17, BYS24, BYS30 BYS43, BYS44, BYS46, BYS47, *S. saprophyticus* BYS18, BYS64 ve *S. sciuri* BYS20 suşlarında *icaA* geninin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2). Bu çalışmada elde edilen bulgunun aksine, Darwish ve Asfour (2013) tarafından yapılan çalışmada *eno* geninden sonra en sık rastlanan genin *icaD* geni olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar mastitisli inek sütlerinden izole ettikleri 40 adet *S. aureus* ve 68 adet KNS izolatının sırasıyla %62.5'inin ve %47.1'inin *icaD* geni içerdiğini tespit etmişlerdir. Ancak bu çalışma kapsamında kullanılan KNS izolatlarının hiçbirinde *icaD* geni tespit edilmemiştir. Diğer taraftan araştırmacılar, *S. aureus* izolatlarının %15'inde, KNS izolatlarının ise %5.9'unda *icaA* geninin varlığını saptamışlardır. Azara vd. (2017) de çalışmalarında kullandıkları 258 adet *S. aureus* suşunun yüksek oranda *eno* geni içermelerine rağmen hiçbirinin *icaA/icaD* geni içermediğini rapor etmişlerdir.

PZR denemeleri sonucu, KNS izolatlarının %12'sinde (*S. xylosus* BYS14, *S. saprophyticus* BYS18, *S. sciuri* BYS20, *S. epidermidis* BYS24, *S. epidermidis* BYS30 ve *S. saprophyticus* BYS64) *eno* ve *icaA* genlerinin birlikte bulunduğu tespit edilmiştir. Khoramian vd. (2015), virülens faktör ve biyofilm özelliklerini araştırdıkları toplam 215 adet *S. aureus* izolatının 162 adedinde *eno* geninin varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı

zamanda izolatların yüksek oranda *icaA* ve *icaD* genlerini de içerdiğini belirlemişlerdir. Test edilen izolatların 189 adedinin (%87.9) *icaA*, 190 adedinin de (%88.4) *icaD* geni içerdiğini

bildirmişlerdir. Benzer olarak, Srednik vd. (2017) de süt kaynaklı 90 adet KNS izolatının %6.2'sinde *eno* ve *icaA* genlerinin birlikte bulunduğunu rapor etmişlerdir.



Şekil 1. Bazı KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında set 2 (*cna-eno-bap*) primer karışımı kullanılarak yapılan mPZR denemesinin agarozel elektrophores görüntüsü

1: *S. saprophyticus* BYS1; 2: *S. saprophyticus* BYS2; 3: *S. saprophyticus* BYS4; 4: *M. caseolyticus* BYS4; 5: *S. saprophyticus* BYS7; 6: *S. saprophyticus* BYS8; 7: *S. cohnii* BYS9; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 8: *S. sciuri* BYS10; 9: *S. saprophyticus* BYS11; 10: *S. vitulinus* BYS12; 11: *S. saprophyticus* BYS13; 12: *S. xylosum* BYS14; 13: *S. saprophyticus* BYS15; 14: *M. caseolyticus* BYS16; 15: negatif kontrol (su)

Figure 1. Image of agarose gel electrophoresis of mPCR test used set 2 (*cna-eno-bap*) primer mix in some CNS and *M. caseolyticus* strains

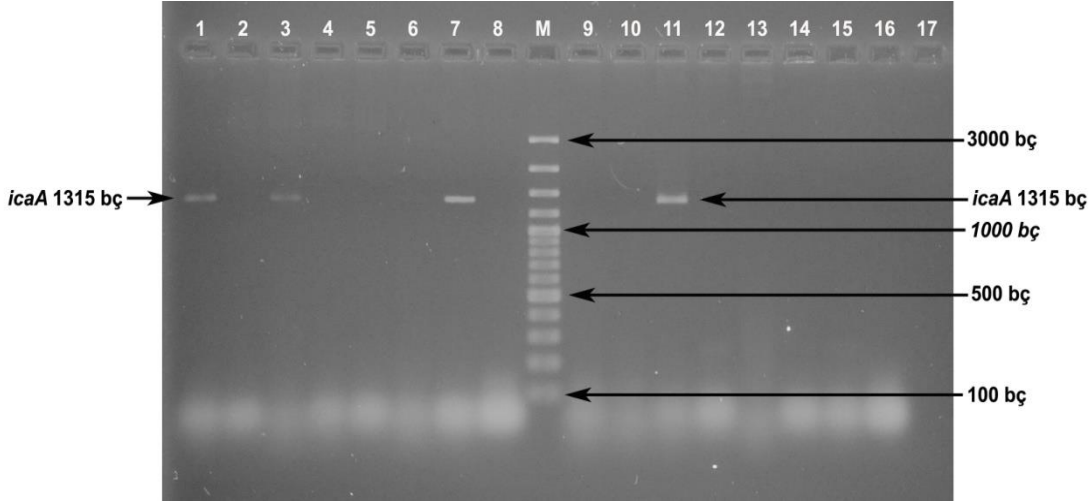
1: *S. saprophyticus* BYS1; 2: *S. saprophyticus* BYS2; 3: *S. saprophyticus* BYS4; 4: *M. caseolyticus* BYS4; 5: *S. saprophyticus* BYS7; 6: *S. saprophyticus* BYS8; 7: *S. cohnii* BYS9; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 8: *S. sciuri* BYS10; 9: *S. saprophyticus* BYS11; 10: *S. vitulinus* BYS12; 11: *S. saprophyticus* BYS13; 12: *S. xylosum* BYS14; 13: *S. saprophyticus* BYS15; 14: *M. caseolyticus* BYS16; 15: negative control (water)

Çalışma kapsamında araştırılan diğer biyofilm oluşumu ile ilişkili genler (*icaD* ve *bap*) ve adezyon genlerinin (*fnbA*, *fnbB*, *fib*, *clfA*, *clfB*, *cna*, *ebpS* ve *bbp*) varlığı hiçbir suşta tespit edilmemiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara benzer olarak Seo vd. (2008), araştırdıkları 71 adet (36 hayvan ve 35 hava kaynaklı) *Staphylococcus* spp. izolatından hiçbirinde *bap*, *fnbA* ve *fnbB* geni varlığını tespit etmemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda sadece 1 adet hayvansal izolatın *bbp* geni içerdiğini bildirmişlerdir. Benzer olarak Vautor vd. (2008) de 262 adet *S. aureus* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların hiçbirinde *bap* geninin varlığını tespit etmemişlerdir. Bir başka çalışmada Simojoki vd.

(2012), mastitisli sığır sütü örneklerinden izole edilen KNS suşlarının hiçbirinin *bap* ve *cna* geni içermediğini, *bbp* (%1.2), *fnbB* (%2.4), *fnbA* (%3.6), *clfB* (%3.6), *clfA* (%4.8), *ebpS* (%4.8) ve *fib* (%4.8) genlerini ise düşük sıklıkla içerdiklerini bildirmişlerdir. Darwish ve Asfour (2013), 40 adet *S. aureus* suşundan sadece 1 adedinin (%2.5), 68 adet KNS izolatının ise 3 adedinin (%4.4) *bap* genine sahip olduğunu bildirmiştir. Khoramian vd. (2015), insan ve inek enfeksiyonlarından izole ettikleri 215 adet *S. aureus* izolatından hiçbirinin *bap* geni içermediğini tespit etmişlerdir. Azara vd. (2017), ise bu çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak 258 adet *S. aureus* izolatının

hiçbirinin *fnbB* geni içermediğini 1 adedinin ise *bbp* geni içerdiğini rapor etmişlerdir. Ancak araştırmacılar bizim çalışmamızda elde edilen

bulgunun aksine suşların yüksek oranda *fib* (%92.2), *clfA/clfB* (%82.5), *ebps* (%80.6) ve *fnbA* (%72.8) geni içerdiğini tespit etmişlerdir.



Şekil 2. Bazı KNS ve *M. caseolyticus* suşlarında set 1 (*fnbB-fib-clfA-clfB-ebpS-bbp-icaA-icaD*) primer karışımı kullanılarak yapılan multiplerks-PZR denemesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

1: *S. saprophyticus* BYS18; 2: *M. caseolyticus* BYS19; 3: *S. sciuri* BYS20; 4: *M. caseolyticus* BYS21; 5: *M. caseolyticus* BYS22; 6: *S. epidermidis* BYS23; 7: *S. epidermidis* BYS24; 8: *S. hominis* BYS27; M: O'GeneRuler™ 100-bç DNA marker (Thermo); 9: *S. epidermidis* BYS28; 10: *M. caseolyticus* BYS29; 11: *S. epidermidis* BYS30; 12: *S. saprophyticus* BYS32; 13: *S. saprophyticus* BYS34; 14: *S. xylosus* BYS35; 15: *S. xylosus* BYS36; 16: *S. xylosus* BYS37; 17: negatif kontrol (su)

Figure 2. Image of agarose gel electrophoresis of multiplex-PCR test used set 1 (*fnbB-fib-clfA-clfB-ebpS-bbp-icaA-icaD*) primer mix in some CNS and *M. caseolyticus* strains

1: *S. saprophyticus* BYS18; 2: *M. caseolyticus* BYS19; 3: *S. sciuri* BYS20; 4: *M. caseolyticus* BYS21; 5: *M. caseolyticus* BYS22; 6: *S. epidermidis* BYS23; 7: *S. epidermidis* BYS24; 8: *S. hominis* BYS27; M: O'GeneRuler™ 100-bp DNA marker (Thermo); 9: *S. epidermidis* BYS28; 10: *M. caseolyticus* BYS29; 11: *S. epidermidis* BYS30; 12: *S. saprophyticus* BYS32; 13: *S. saprophyticus* BYS34; 14: *S. xylosus* BYS35; 15: *S. xylosus* BYS36; 16: *S. xylosus* BYS37; 17: negative control (water)

Stafilokoklarda poli-N-süksinil-β-1-6 glikozamin polisakkarit tutunma matriksinin üretiminden *icaADBC* gen kümesinin sorumlu olduğu ortaya konulmuştur. Bu matriksin hücrelerin birbirine yapışmasında etkin rol aldığı varsayılmaktadır. Bu nedenle *icaADBC* gen kümesini içeren stafilokok suşlarının potansiyel biyofilm üreticisi olduğu kabul edilmektedir (Cramton vd., 1999; Götz, 2002; Szweda vd., 2012; Yüksekdağ ve Baltacı, 2013). Yapılan farklı çalışmalarda fenotipik olarak CRA'da siyah koloni veren suşların genotipik olarak da *icaA* veya *icaD* veya her iki geni birlikte içerdiği gösterilmiştir. Ayrıca *icaA* ve *icaD* genlerinin bir arada bulunduğu ve ifade edildiği suşlarda söz konusu genlerin tek tek yer aldığı suşlara kıyasla biyofilm üretiminin daha fazla

olduğu bildirilmiştir (Atshan vd., 2012; Zhou vd., 2013). Bu bulguların aksine araştırma kapsamında *icaA* geni içerdiği tespit edilen *S. epidermidis* BYS46 suşunun CRA besiyerinde fenotipik olarak slaym üretim özelliğinin test edildiği denemelerde pembe koloni verdiği tespit edilmiştir. Araştırmada elde edilen bu bulgulara benzer olarak çeşitli çalışmalarda da farklı kaynaklardan izole edilen *S. aureus* ve KNS izolatlarında biyofilm oluşumunun *ica* genleri varlığında olabileceği gibi bu genlerden bağımsız olarak da biyofilm üretilebileceği bildirilmiştir (Vasudevand vd., 2002; Şahin, 2007; Mariana vd., 2009; Szweda vd., 2012; Oniciuc vd., 2016; Gajewska ve Chajęcka-Wierzckowska, 2020). Vasudevand vd. (2002), izole ettikleri 35 adet metisilin dirençli *S.*

aureus (MRSA) suşunda biyofilm oluşturma özelliklerini CRA besiyerinde fenotipik olarak araştırmış biyofilm pozitif suşların *ica* lokusu, *icaA* ve *icaD* genleri ile ilişkilerini *in vitro* ortamda incelemiştir. Araştırmacılar CRA besiyerinde 35 MRSA izolatından 24'ünün siyah koloni oluşturduğunu yani biyofilm ürettiğini gözlemlemiştir. Diğer taraftan izolatların tamamında *icaA* ve *icaD* geni varlığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *ica* genleri varlığının CRA besiyerinde fenotipik olarak tespit edilen biyofilm oluşumu ile her zaman ilişkilendirilemeyeceğini ve biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılmasında fenotipik ve genotipik testlerin bir arada kullanılması gerektiğini vurgulamışlardır. Şahin (2007), tarafından yapılan çalışmada CRA ortamlarında tespit edilen 66 biyofilm pozitif izolatın 65'inde (%98.5) *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisi de pozitif saptanmış, 1'inde (%1,5) her iki gen de negatif bulunmuştur. Biyofilm negatif olarak değerlendirdiği 86 örneğin ise 71'inde (%82.6) *icaA* ve *icaD* genlerinin her ikisi de pozitif saptanmış, 15'inde (%17.4) her iki gen de negatif bulunmuştur. Bu sonuçlara göre biyofilm üretimi ile *icaA* ve *icaD* genleri arasında iyi derecede ilişki bulunmuştur fakat *ica* genlerinin varlığının her zaman biyofilm oluşumuyla sonuçlanmadığı gösterilmiştir. Benzer olarak Mariana vd. (2009), 100 MRSA izolatının biyofilm oluşturma özelliklerini fenotipik ve genotipik yöntemler kullanarak araştırmışlardır. CRA besiyerinde izolatların %78'inin biyofilm oluşturduğunu (siyah koloni), %22'sinin ise biyofilm oluşturmadığını (pembe koloni) tespit etmişler ve biyofilm oluşturan izolatların tamamında *icaA* ve *icaD* geni varlığını saptamışlardır. Benzer sonucun tespit edildiği bir başka çalışmada Polonya'daki mastitisli ineklerden izole edilen 132 *S. aureus* suşunun hepsinde *icaA* ve *icaD* geni tespit edilmesine rağmen fenotipik ifadeye dayalı deneyler sonucunda 76'sı (%57,6) biyofilm üretimi pozitif olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu suşların hepsinde *icaA* ve *icaD* genleri bulunmasına rağmen hiçbirinde *bap* geninin bulunmadığı tespit edilmiştir (Szweda vd., 2012). Benzer olarak bizim çalışmamızda da *icaA* geni taşıdığı tespit edilen *S. xylosus* BYS14, *S. epidermidis* BYS17, BYS24, BYS30, BYS43, BYS44, BYS46,

BYS47, *S. saprophyticus* BYS18, BYS64 ve *S. sciuri* BYS20 suşlarının da *bap* geni içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 3).

SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, sucuğun biyofilm oluşturabilen KNS ve *M. caseolyticus* kaynağı olduğunu göstermiştir. İzolatların yarısından fazlasının slaym ve biyofilm üreticisi olduğu belirlenmiştir. Biyofilmlerin oluşumundan sorumlu olan mekanizmaları ve genetik temelleri anlamak, biyofilm oluşumunu önlemek ve uygun önlemlerin alınmasını sağlamak için önemli bir unsurdur. PZR tekniği biyofilm üretiminin genetik temelinin değerlendirmek için tek başına yetersiz olabilir. Bir genin varlığı ya da yokluğu, kodlanmış proteinin, stafilokokların biyofilm oluşturma yeteneğinde rol oynadığını doğrudan göstermez. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalar ile biyofilm üreticisi olduğu tespit edilen ancak gen içermeyen 8 KNS suşunda biyofilm üretme yeteneğinin genetik yapısını daha iyi anlamak için gelişmiş moleküler biyoloji tekniklerinin kullanılması gerekmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yazarların, başka kişiler veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Bu çalışma BÖT tarafından tasarlanmış, analizler BÖT ve GAY tarafından gerçekleştirilmiştir. Yazarlar makalenin yazımına katkıda bulunmuş, BÖT son halini okuyarak onaylamıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı 4204-YL1-14 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Atshan, S.S., Shamsudin, M.N., Sekawi, Z., Lung, L.T.T., Hamat, R.A., Karunanidhi, A., Ali, A.M., Ghaznavi-Rad, E., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Seng, J.S.C., Nathan, J.J., Pei, C.P. (2012). Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Biotechnol*, 976-972.

- Azara, E., Longheu, C., Sanna, G., Tola, S. 2017. Biofilm formation and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* isolates collected from ovine mastitis. *J Appl Microbiol*, 123: 372-379.
- Brooks, J.D. and Flint, S.H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int J Food Sci Technol*, 43: 2163–2176.
- Busconi, M., Zacconi, C., Scolari, G. (2014). Bacterial ecology of PDO copa and pancetta piancentina at the end of ripening and after MAP storage of sliced product. *Int J Food Microbiol*, 172: 13-20.
- Cancilla, M.R., Powell, L.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.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nichols, W.W., Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun*, 54:27-5433.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., Penadés, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Microbiology*, 183: 2888-2896.
- Darwish, S.F., Asfour, H.A.E. (2013). Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *Sci World J*, 378-492.
- Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase-negative *staphylococci*. *J Clin Path*, 42: 872-874.
- Gajewska, J. Chajęcka-Wierzckowska, W. (2020). Biofilm formation ability and presence of adhesion genes among coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolates from raw cow's milk. *Pathogens*, 9:654.
- Geniş, B., Tuncer, Y. (2018). Determination of antibiotic susceptibility and decarboxylase activity of coagulase-negative *Staphylococcus* and *Micrococcus caseolyticus* strains isolated from fermented Turkish sausage (Sucuk). *J Food Process and Preserv*, 42: e13329.
- Götz, F. (2002). *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol*, 43(6): 1367-1378.
- Kaban, G., Kaya, M. (2008). Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (Sucuk). *J Food Sci*, 73: 385-388.
- Kesmen, Z., Yarimcan, B., Aslan, H., Yetim, H. (2014). Application of different molecular techniques for characterization of catalase-positive cocci isolated from sucuk. *J Food Sci*, 79 (2): 222-228.
- Khoramian, B., Jabalameli, F., Niasari-Naslaji, A., Taherikalani, M., Emaneini, M. (2015). Comparison of virulence factors and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and bovine infections. *Microbial Patho*, 88: 73-77.
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L. (1994). Update on clinical significance of coagulase- negative 573 staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 7: 117-140
- Kong, C., Chee, C.F., Richter, K., Thomas, N., Rahman, N.A., Nathan, S. (2018). Suppression of *Staphylococcus aureus* biofilm formation and virulence by a benzimidazole derivative, UM-C162. *Sci. Rep*, 8: 1-16.
- Leroy, F., Giammarino, P., Chacornac, J.P., Lebert, I., Talon, R. (2010). Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small scale processing units. *Food Microbiol*, 27 (2): 294-301.
- Los R., Sawicki R., Juda M., Stankevic M., Rybojad P., Sawicki M., Malm A., Ginalska G., (2010). A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 310: 97-103.
- Melo, P.D.C., Ferreira, L.M., Filho, A.N., Zafalon, L.F., Vicente, H.I.G., de Souza, V. (2013). Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus*

- isolated from bovine subclinical mastitis. *Braz J Microbiol*, 44, 119–124.
- Mariana, N. S., Salman S. A., Neela V., Zamberi, S. (2009). Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolated of meticillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *African J Microbiol Res*, 3(6): 330-338.
- Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S.F., Carneiro, C., Cavaco, L.M., Bernardo, F., Vilela, C.L. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol*, 118, 133–140.
- Oniciuc, E.A., Cerca, N., Nicolau, A.I. (2016). Compositional analysis of biofilms formed by *Staphylococcus aureus* isolated from food sources. *Front Microbiol*, 7: 390.
- Piette, A., Verschraegen, G. (2009) Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol*, 134 (1-2): 45.
- Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Leroy, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fadda, S., Talona, R. (2007) Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiol*, 24: 44-51.
- Ramos, G.L.P.A., Vigoder, H.C., Nascimento, J.S. (2021). Technological applications of *Macrocooccus caseolyticus* and its impact on food safety. *Curr Microbiol*, 78: 11-16.
- Rogers, K. L., Fey, P. D., Rupp, M. E. (2009). Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin N Am*, 23: 73-98.
- Schlegelova J., Babak V., Holasova M., Konstantinova L., Necidova L., Šišák F., Vlkova H., Roubal P., Jaglic Z. (2010). Microbial contamination after sanitation of food contact surfaces in dairy and meat processing plants. *Czech J Food Sci*, 28: 450–461.
- Seo, Y.S., Lee, D.Y., Rayamahji, N., Kang, M.L., Yoo, H.S. (2008). Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristic of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. *Research in Vet Microbiol*, 92: 179-185.
- Simojoki, H., Hyvönen, P., Plumed Ferrer, C., Taponen, S., Pyörälä, S. (2012). Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? *Vet Res*, 158: 344-352.
- Srednik, M.E., Tremblay, Y.D.N., Labrie, J., Archambault, M., Jacques, M., Cirelli, A.F., Gentilini, E.R. (2017). Biofilm formation and antimicrobial resistance genes of coagulase-negative staphylococci isolated from cows with mastitis in Argentina. *FEMS Microbiol Lett*, 364: 1-8.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Čircović, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates. *Apmis*, 115: 891-899.
- Szweda P., Schielmann M., Milewski S., Frankowska A., Jalcubezak A. (2012). Biofilm production and presence of ica and bap genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in eastern Poland. *Pol J Microbiol*. 61: 65-9.
- Şahin. R. (2007). *Staphylococcus aureus* suşlarında biofilm üretimi, biofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması, Pamukkale Üniveritesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- Talon, R., Leroy, S. (2011). Diversity and Safety Hazards of Bacteria Involved in Meat Fermentations. *Meat Science*, 89, 303–309.
- Toledo Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penades, J.R., Lasa, I. (2001). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4538-4545.
- Vasudevan, P., Nair M.K.M., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet Microbiol*, 92: 179-185.
- Vautor E, Abadie G, Pont A, Thierry R. (2008) Evaluation of the presence of the *bap* gene in

Staphylococcus aureus isolates recovered from human and animals species. *Vet Microbiol*, 127:407-11.

Yüksekdağ, Z.N., Baltacı, N. (2013). *Staphylococcus aureus* türlerinde biyofilm ve biyofilm oluşumundan sorumlu genler. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 43(3): 77-83.

Zhou, S., Chao, X., Fei, M., Dai, Y., Liu, B. (2013). Analysis of *S. epidermidis icaA* and *icaD* genes by polymerase chain Reaction and slime production: a case control study, *BMC Infec Dis*, 13: 242.



GDO ANALİZLERİNDE KULLANILAN CRM İZOLATLARININ KONTROLLÜ MUHAFAZA KOŞULLARINDA TEKRAR KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Ayşe Dağdelen^{1*}, Nihal Akman¹, Münevver Müge Çağal²

¹ Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bursa, Türkiye

² Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bursa, Türkiye

Geliş / *Received*: 20.12.2020; Kabul / *Accepted*: 09.03.2021; Online baskı / *Published online*: 25.03.2021

Dağdelen, A., Akman, N., Çağal, M.M. (2021). GDO analizlerinde kullanılan CRM izolatlarının kontrollü muhafaza koşullarında tekrar kullanım olanaklarının araştırılması. *GIDA* (2021) 46(3) 515-527 doi: 10.15237/gida. GD20142

Dağdelen, A., Akman, N., Çağal, M.M. (2021). Investigation of reuse capabilities of CRM isolates used in GMO analysis in the controlled storage conditions. GIDA (2021) 46(3) 515-527 doi: 10.15237/gida. GD20142

ÖZ

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) potansiyel yararları nedeniyle tarımsal ürünler başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Yasal düzenlemelere göre gıda ve yemlerde GDO varlığının bilinmesi zorunludur. Analizlerde sonuçların doğruluğu, kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve kalite kontrol çalışmalarında sertifikalı referans maddeler (CRM) kullanılmaktadır. Çalışma ile bitkisel ürünlerde GDO analizlerinde kullanılan CRM izolatlarının tekrar kullanılabilirlik olanaklarının belirlenmesi amacıyla dondur-çözdür uygulaması ile meydana gelebilecek degradasyon araştırılmıştır. Bunun için soya ve mısır CRM'lerinden elde edilen izolatları kontrollü koşullarda belirli periyotlarla (5, 10, 15, 20 kez) dondurma (-20±2°C) ve çözündürme (22±2°C) işlemleri uygulanmıştır. Real time PCR cihazında yapılan analizler sonucunda 20 dondur-çözdür uygulamasına kadar CRM izolatlarının tekrar kullanılabilirliği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Bitki, DNA, İzolat, Dondur-Çözdür

INVESTIGATION OF REUSE CAPABILITIES OF CRM ISOLATES USED IN GMO ANALYSIS IN THE CONTROLLED STORAGE CONDITIONS

ABSTRACT

Genetically modified organisms (GMOs) are used in many areas, especially in agricultural crops, due to their potential benefits. According to legal regulations, it is imperative to know the presence of GMOs in food and feed. Certified reference materials (CRM) are used in the accuracy of the analyzes, preparation of calibration curve, and in quality control studies. In this study, degradation occurring with freeze-thaw application has been investigated in order to determine the reuse possibilities of CRM isolates used in GMO analysis in herbal products. For this, freezing (-20 ± 2 ° C) and thawing (22 ± 2 ° C) processes were applied to the isolates obtained from soy and corn CRMs at certain periods (5, 10, 15, 20 times) under controlled conditions. Real time PCR analysis results showed that up to 20 freeze-thaw applications, CRM isolates were reusable.

Keywords: Plant, DNA, Isolate, Freeze-Thaw

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ayse.dagdelen@tarimorman.gov.tr

☎ (+90) 224 246 47 20

☎ (+90) 224 246 19 41

Ayşe Dağdelen; ORCID no: 0000-0002-9737-4652

Nihal Akman; ORCID no: 0000-0003-4611-9106

Münevver Müge Çağal; ORCID no: 0000-0002-1786-1216

GİRİŞ

Biyoteknolojik çalışmaların en önemli ürünü olan genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) (Genetically Modified Organisms - GMO), günümüzde tıp, tarım, veterinerlik başta olmak üzere geniş bir alanda kullanılmaktadır. Son 30 yılda DNA'nın yapısının daha iyi anlaşılması nedeniyle rekombinant DNA teknolojisine dayanan modern tarımsal biyoteknoloji alanı hızla gelişmiştir. Biyoteknolojik bu ürünlerin çiftçilere ve tüketicilere önemli tarımsal, çevresel, ekonomik, sağlık ve sosyal faydalar sağlaması ile de ticarileşmesi çok hızlanmıştır. Tarımsal ürünlerde yapılan bu çalışmalar sonucunda antibiyotik stres toleransı, böcek direnci, herbisit toleransı, hastalık direnci, ürün kalitesi, tozlaşma kontrolü, büyüme ve verim özellikleri başta olmak üzere 44 farklı karakteristik özellik kazandırılmıştır. 1980'lerde başlayan bu çalışmalar 2020 yılına gelindiğinde ticari olarak 32 farklı bitkide 526 farklı GDO tipi üretilmiştir. Bu ürünlerin dünyada ABD, Brezilya, Arjantin, Hindistan ve Kanada başta olmak üzere 26 ülkede 192 milyon hektar alanda ekimi yapılmaktadır. Ürünler içerisinde en çok soya (%50), mısır (%31), pamuk (%13), kanola (%5) ve diğerleri (%1) olarak sıralanmaktadır (Anonymous, 2020a).

GDO'ların potansiyel faydalarına rağmen hala bazı belirsizliklerinin bulunması, bilimsel olarak tartışılmasına ve tüketicilerde kaygılara neden olmaktadır. Bu durum gıda ve yemlerdeki GDO varlığı ile ilgili yasal düzenlemeler yapılmasına neden olmuştur. Avrupa Komisyonunun (European Commission – EC) 1829/2003 sayılı düzenlemesinde gıda ve yemlerde %0.9'un üzerinde GDO bulunması durumunda etikette belirtilmelidir (Anonymous, 2003). Ülkemizde ise 5977 sayılı "Biyogüvenlik Kanunu" ile "Genetik yapısı değiştirilmiş organizmalar ve ürünlerine dair yönetmelik" gereğince gıdalarda GDO kullanımı yasaklanmış olup yemlerdeki kullanımında ise EC ile benzer kısıtlamalar bulunmaktadır (Anonymous, 2010a; 2010b).

Gıda veya yem ürünlerinde GDO varlığının belirlenmesinde proteine dayalı (Elisa yöntemi) ve nükleik aside dayalı (Polimeraz zincir reaksiyonu – PCR, DNA mikrodizi ve Sensörler) analitik

yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler içerisinde hassasiyet ve hız avantajından dolayı PCR en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntem, iyi tanımlanmış DNA sekanslarının saptanmasına, çoğaltılmasına ve nispi olarak ölçülmesine dayanır. Spesifik bir DNA sekansının ölçülen miktarının başka bir DNA sekansının ölçülen miktarıyla ilişkilendirilmesi sonucunda bir DNA fragman oranı ortaya çıkar. Ölçülen bir floresan sinyalinin çalışılan DNA fragmanının miktarı veya kütlesi için karakteristik bir miktara dönüştürmek için PCR'nin kalibre edilmesi gerekir (Corbisier vd., 2017). Bu amaçla farklı formlardaki sertifikalı referans maddeler (certified reference materials – CRM) kullanılır. CRM'ler; laboratuvarlar tarafından elde edilen test sonuçlarına güveni artıran kalite güvence araçlarıdır. Kesin referans değerleri ve veriler sağlayarak laboratuvar cihazlarının kalibrasyonunda anahtar rol oynarlar (Anonymous, 2020b).

Analizlerde güvenilir ve ölçülebilir verileri elde etmek için kararlı standartların kullanılması gerekmektedir. Özellikle DNA bazlı CRM'lerin kullanılacak DNA standartları ölçülür, seri olarak seyreltilir ve daha sonra kalibrasyon çizgisi için kullanılır. Bu işlem prosedürünün özenli ve dikkatli yapılması gerektiğinden standartların muhafazası da önemlidir. Standartların uzun süreli muhafazası maliyet ve zamandan tasarruf sağlarken, DNA çözeltileri bozulmaya eğilimlidir (Röder vd., 2010).

DNA çift zincirli sarmal yapısı nedeniyle bilinen en kararlı moleküllerden biridir. Bu yapısal özelliğinden dolayı omurgalı bir hayvanın milyonlarca yıllık DNA'sı bile korunabilmektedir (Gaikwad, 2020). Ancak DNA çekirdek ya da organelden çıkarıldığında aynı durum sözkonusu değildir. DNA kararlı bir molekül olmasına rağmen, DNA'nın bütünlüğü çevresel faktörlere ve özellikle de zamana bağlıdır (Rice ve Haussler, 2018). Uzun süre soğukta depolanan ya da kısa süre oda sıcaklığında bekletilen örneklerde zamanla meydana gelen UV radyasyonu, oksidasyon, hidroliz, fiziksel etkiler gibi enzimatik olmayan nükleik asit degradasyonu özellikle önemlidir. Lee (2010) tarafından yapılan çalışmada muhafaza sırasında su ve oksijenin varlığının DNA'nın hidroliz ve oksidasyonuna

neden olduğu bildirilmiştir. Rice ve Haussler (2018) tarafından yapılan çalışmada ise, dondurulan izolatlarda oluşan buzların nükleik asitleri kesebileceği ya da dondurulunca daha küçük bir hacim içerisine sıkışmak zorunda kalan nükleik asit iplikçiklerinin fiziksel stres sonucu dolaşarak karmaşık bir yapı oluşturabileceği belirtilmiştir.

Nükleik asitlerin muhafazasında kullanılan dondur-çözdür döngüsü uzun yıllardır kullanılan ancak dezavantajlarının tam olarak belirlenemediği bir yöntemdir. Bu döngünün kabul değerleri aslında nihai kullanım amacına ve ekstraksiyon tipine bağlıdır. Dondur-çözdür uygulamalarının olumsuz etkisini azaltmak için DNA'nın EDTA gibi gliserol/DMSO içeren bir solüsyon içerisinde, düşük iyon dayanımlı, hafif alkalin tamponlu bir ortamda depolanması önerilmiştir. Buna rağmen DNA degradasyonu oluşabilmektedir (Brunstein, 2015).

Nükleik asitlerin bozunma kinetiği üzerine uzun yıllardır araştırmalar yapılmaktadır. 1990'lerden günümüze kadar olan literatür incelendiğinde çalışmaların DNA ya da RNA'da yapıldığı görülmüştür. Bu çalışmalardan DNA'da yapılanlar sözkonusu olduğunda çoklu dondur-çözdür işlemlerinin DNA'nın stabilitesini etkilediği sonucuna Ross vd. (1990), Lahiri ve Schnabel (1993), Shao vd. (2012) ve Al-Warid (2014)'in çalışmalarında rastlanmıştır. Ancak DNA'nın etkilenmediği uygulamalar da mevcuttur (Widell vd., 1991; Bellele vd., 2003; Şanlıdağ vd., 2005; Schaudien vd., 2007; Rosmanith vd., 2010; Fan vd., 2019). Stabilitate çalışmaları parazit ya da virüs gibi farklı kaynaklardan izole edilen nükleik asitlerde yapılmakla beraber dondur-çözdür uygulamalarındaki sıcaklık, süre, sıklık gibi parametrelerde de farklılıklar bulunmaktadır. Analiz yöntemi olarak elektroforez (Ross vd., 1990; Shao vd., 2012; Al-Warid, 2014), nested PCR (Halfon vd., 1996) ve Real Time kantitatif PCR (Granados vd., 2017; Schaudien vd., 2007) kullanılmıştır. Ayrıca muhafazada ilave kimyasal kullanımı da degradasyonu azaltıcı yönde etki yapabilmektedir (Schaudien vd., 2007). Bitkisel kaynaklı numunelerde ise DNA'nın dondur-çözdür uygulamalarına dayanımı ile ilgili

literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, GDO analizlerinde sonuçların doğruluğu, kalibrasyon eğrisinin hazırlanması ve kalite kontrol çalışmalarında sıklıkla kullanılan CRM'lerden elde edilen izolatların analiz prosedürü gereği dondur-çözdür uygulamalarına karşı dayanımlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada GDO analizlerinde en sık karşılaşılan bitki spesifik türlerden soyaya ait DP-305423-1 tipinin ERM-BF426c (%1) ve ERM-BF426d (%10); mısıra ait DAS-40278-9 tipinin ERM-BF433c (%1) ve ERM-BF433d (%10) kodlu CRM'leri kullanılmıştır. Bu CRM'ler Avrupa Referans Materyalleri (European Reference Materials - ERM)'nden temin edilmiştir. CRM'ler analize alınmaya kadar karanlıkta ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Yöntem

CRM'lerin izolasyonu

Çalışmada kullanılan izolasyon kiti Eurofins GENESpin'den temin edilmiştir (Anonymous, 2016). Bu kitler analize alınmaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Kit içeriği Lysis Buffer (deterjan), Proteinaz K, Binding Buffer (DNA'yı kolona bağlama çözeltisi), CQW, W1 ve W2 kodlu yıkama çözeltileri ve Elution Buffer (DNA'yı kolondan ayıran çözelti)'dan oluşmaktadır. RNA inhibisyonu için Sigma-Aldrich marka R6513 RNase enzim çözeltisi kullanılmıştır. RNase çözeltisi çalışma süresi boyunca -20°C'de muhafaza edilmiştir. Tüm CRM'ler 0.2 g 2 mL'lik santrifüj tüplerine tartılmış, 550 µL Lysis Buffer ve 10 µL Proteinaz K eklenerek Ika marka Ms1 model vortekste vortekslenmiş, 65°C'de 30 dk. Biosan marka Ts-100 tip çalkalamalı kuru blok ısıtıcıda tutulmuştur. Daha sonra 20 µL Rnase enzimi eklenerek oda sıcaklığında 30 dk. tutulmuştur. 14000 rcf'de 10 dk. santrifüj yapılmıştır. Santrifüj olarak Hettich marka Mikro 22r model santrifüj kullanılmıştır. DNA bağlanması aşaması için temiz ve berrak kısım 2 mL'lik tüpe alınmıştır. Alınan kısım kadar Binding Buffer ve etanol ilave edilmiş ve 30 sn vortekslenmiştir. Karışım filtreli tüpe aktararak

11000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılmıştır. Yıkama ve kurutma aşamaları için alta geçen kısım dökülerek filtreye 400 µL CQW eklenmiş ve 11000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılmıştır. Alta geçen kısım dökülerek filtreye 700 µL W1 eklenmiştir. 11000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılmış, alta geçen kısım dökülerek filtreye 200 µL W2 eklenmiştir. 11000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapılmış, filtreye yeniden 200 µL CQW eklenmiştir. 11000 rpm'de 2 dk. santrifüj yapılmış, elüsyon aşamasında filtre 1.5 mL'lik tüpe yerleştirilmiştir. Filtreye 100 µL 70 °C sıcaklığında Elution Buffer ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk. inkübasyona bırakıldıktan sonra 11000 rpm'de 1 dk. santrifüj yapılarak filtre atılmıştır. Saflaştırma için numuneler kolonlara pipetlenerek 800 rcf'de 2 dk. santrifüj yapılmış ve kolonlar atılmıştır. İzolasyon sonucu elde edilen 100 µL izolattan 1.5 µL pipetle alınmıştır. Nükleik asit saflıkları ve ng/µL düzeyinde konsantrasyonlar Thermo Scientific marka Nanodrop 2000 model spektrofotometrede 260/280 nm dalga boyunda okunmuştur.

Dondur-çözdür uygulamaları

Miktar analizi ile ilgili referans alınan EURL metodlarında başlangıç konsantrasyonu olarak soya için 20 ng/µL ve mısır için 40 ng/µL konsantrasyon düzeyi olması gerektiği belirtilmektedir. Bu nedenle soya ve mısır CRM izolatlarının konsantrasyon düzeyleri dondur-çözdür uygulamaları sırasında meydana gelebilecek kayıplar dikkate alınarak başlangıçta 60 ng/µL olarak ayarlanmıştır. Her biri 100 µL olacak şekilde 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtılan bu izolatlar -20±2°C ve 22±2°C sıcaklık koşullarında 5, 10, 15 ve 20 kez dondur-çözdür uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Dondur-çözdür uygulamaları 1 gün süreyle dondurma, 1 saat süresince çözme şeklinde kontrollü sıcaklık koşulları sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Her 5 dondur-çözdür uygulamasında dondur-çözdür işlemleri bitenler tekrar çözdürülmeksizin diğerlerinden ayrılarak son dondur-çözdür uygulamasına kadar muhafaza edilmiştir. Dondur-çözdür işlemleri sonunda izolatların tamamı dolaptan çıkarılıp çözdürülerek taze izole edilen CRM'lerle beraber Real time PCR'da %GDO miktar analizi yapılmıştır.

Miktar analizi

Çalışmada soya için Mazzara vd. (2013) ve mısır için Savini vd. (2012) EURL metodları kullanılarak Real time PCR cihazında GDO miktar analizleri yapılmıştır (Anonymous, 2009; Savini vd., 2012; Mazzara vd., 2013). Miktar analizi için %10 GDO'lu taze izolatlardan, dört seviyede (S1, S2, S3 ve S4) metotlarda belirtilen kopya sayılarında saf su ile standartlar hazırlanmıştır. Soya için bu seviyeler reaksiyon başına S1: 100 ng, S2: 20 ng, S3: 4 ng ve S4: 0,8 ng %10'luk DP305423 CRM içerecek şekilde kopya sayısı seyreltilerek elde edilmiştir. Mısır için ise bu seviyeler reaksiyon başına S1: 200 ng, S2: 40 ng, S3: 8 ng ve S4: 1,33 ng %10'luk DAS40278 CRM içerecek şekilde düzenlenmiştir. Amplifikasyonda ise öncelikle reaksiyon karışım çözeltisi hazırlanmış, bunun için reaktif çözeltisi, su, Ella Biotech'ten temin edilen referans ve hedef kısımlara özgü probler, reverse ve forward primerler metotlarda belirtilen miktarlarda 2 mL'lik mikrosantrifüj tüplerinde birleştirilmiştir. Ardından düşük hızda vortekslenip kısa süre santrifüj edilmiştir. Reaksiyon karışım çözeltilerinde reaktif çözelti olarak TaqMan kullanılmıştır. Bu karışımın ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne 60 µL alınarak üzerine 15 µL numune/standart eklenip 10 saniye vortekslenip sonra kısa süre santrifüj edilmiştir. Daha sonra bu 75 µL'lik karışımın plate kuyucuklarına (her kuyucuk 1 reaksiyonu temsil etmektedir) otomatik pipetlerle her kuyucuğa 25 µL olacak şekilde pipetlenmiştir (75 µL / 3 = 25 µL). Optik filmler ile kapatılan kuyucuklar plate santrifüjde 3000 rpm'de 1 dk. santrifüj edilmiş, son olarak Real Time PCR cihazına yerleştirilmiştir. Başlangıç denatürasyonu (95°C sıcaklıkta 600 sn.), primer bağlanması (95°C sıcaklıkta 15 sn.) ve primer uzamasını (60°C sıcaklıkta 60 sn.) içeren amplifikasyon 45 döngü olarak, Kopya Sayısı Metodu (Standart Eğri Metodu)'na göre gerçekleştirilerek hedef ve referans kısımlar için kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberinde (Anonymous, 2018) yer alan doğruluk, doğruluk ve kesinlik parametrelerine göre standart eğrilerin uygunluğu değerlendirildikten sonra elde edilen kopya sayılarından % GDO miktarları aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

%GDO = (Hedef Kopya Sayısı / Referans Kopya Sayısı) * 100

İstatiksel yöntem

Verilerin normal dağılıma göre uygunluğu Shapiro Wilks testi ile incelenmiştir. Verilerin normal dağılım göstermesi durumunda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Parametrik testlerin kullanılması durumunda betimleyici istatistikler ortalamaya±standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $\alpha=0,01$ kabul edilmiştir. Verilerin analizi SPSS v22 paket programı ile yapılmıştır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

İzolasyon bulguları

Nanodrop Spektrofotometresinde 260 ve 280 nm dalga boylarında CRM'lerden elde edilen izolatlarda yapılan absorbans ölçümleri sonucunda elde edilen başlangıç verileri Çizelge 1 ve Çizelge 2'de verilmiştir. Eurofins GENESpin kit protokolüne göre 260/280 nm'deki absorbansların oranı 1.6-1.9 arasında olmalıdır (Anonymous, 2016). Buna göre ölçüm sonuçlarının soya ve mısırın her iki konsantrasyon düzeyi için de uygun olduğu görülmüştür. Bu durum izolasyonun istenilen verim ve kalitede gerçekleştirildiğini göstermektedir.

Çizelge 1. Soya CRM izolatlarına ait Nanodrop Spektrofotometre ölçüm bulguları
Table 1. Nanodrop Spectrophotometer measurement findings of Soybean CRM isolates

Soya CRM (DP-305423-1)				
No	%10'luk için		%1'lik için	
	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/ μ L)	Safılık (260/280 nm)	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/ μ L)	Safılık (260/280 nm)
1	137.6	1.88	116.0	1.78
2	71.2	1.88	92.7	1.74
3	87.4	1.85	66.1	1.77
4	96.2	1.83	60.6	1.66
5	101.3	1.80	101.8	1.71
6	140.2	1.84	119.2	1.78
7	71.4	1.86	74.8	1.70
8	176.5	1.82	96.5	1.78

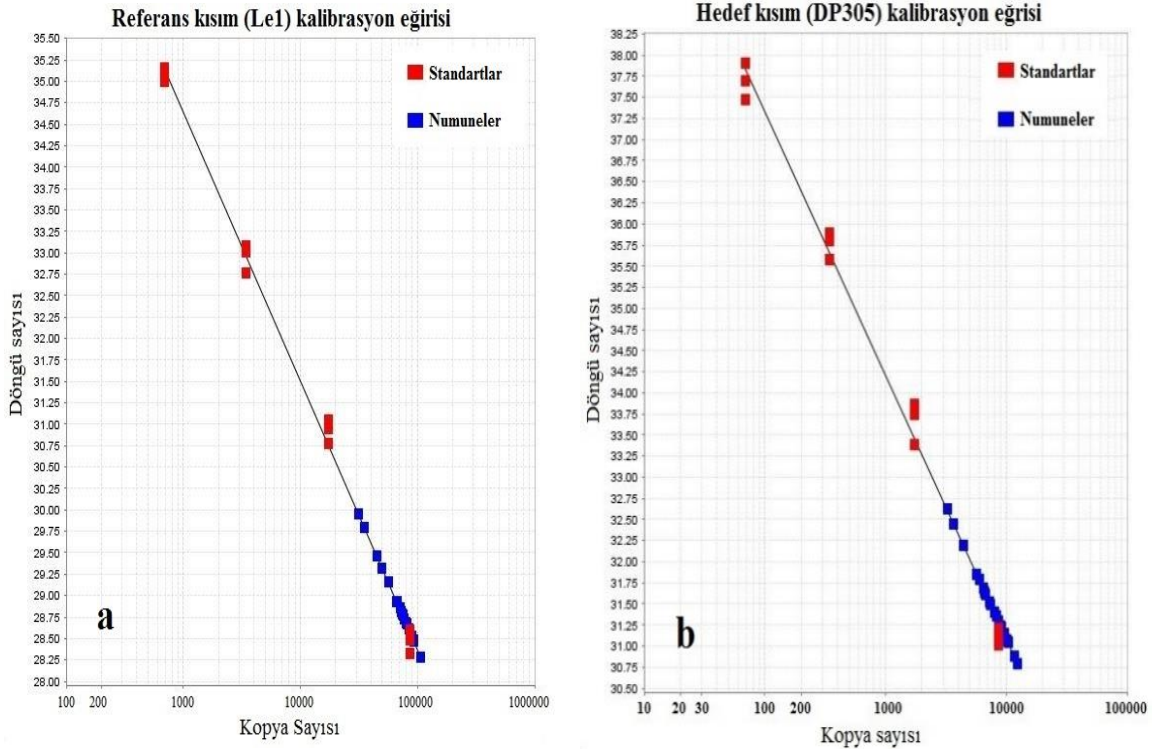
Çizelge 2. Mısır CRM izolatlarına ait Nanodrop Spektrofotometre ölçüm bulguları
Table 2. Nanodrop Spectrophotometer measurement findings of maize CRM isolates

Mısır CRM (DAS-40278-9)				
No	%10'luk için		%1'lik için	
	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/ μ L)	Safılık (260/280 nm)	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/ μ L)	Safılık (260/280 nm)
1	215.3	1.86	217.7	1.88
2	92.2	1.78	157.0	1.85
3	108.7	1.78	154.3	1.88
4	97.1	1.71	154.2	1.87
5	94.4	1.77	207.0	1.86
6	100.6	1.76	140.3	1.85
7	60.1	1.66	112.9	1.84
8	102.3	1.64	120.7	1.86

DNA'nın muhafazasında major tehditlerden birisinin nükleaz kontaminasyonu olduğu bilinmektedir (Rice ve Haussler, 2018). DNA molekülü nükleazlara karşı duyarlı olduğundan bu bulaşanlardan kolayca etkilenebilmektedir. Bununla beraber iyi saflıktaki DNA'nın muhafaza sırasındaki dondur-çözdür döngülerinden etkilenmediği bildirilmiştir (Gaikwad, 2020). Çalışmamızdaki izolasyon bulguları dikkate alındığında sonuçlar bu görüşü desteklemektedir.

Soya CRM'ine ait %GDO miktar bulguları

Soya CRM'lerine ait % GDO miktar analizleri sonucunda hesaplanan kalibrasyon eğrileri Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir. Bu kalibrasyon verilerinin kantitatif metodlar için metod verifikasyon parametreleri ve performans kriterleri (Anonymous, 2018)'ne uygunluğu Çizelge 3'de, Soya CRM izolatlarının dondur-çözdür uygulamaları sonrası Real Time PCR'da yapılan %GDO miktar bulguları da Çizelge 4, Şekil 3 ve Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 1. %10'luk Soya CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, a: Referans kısım, b: Hedef kısım.

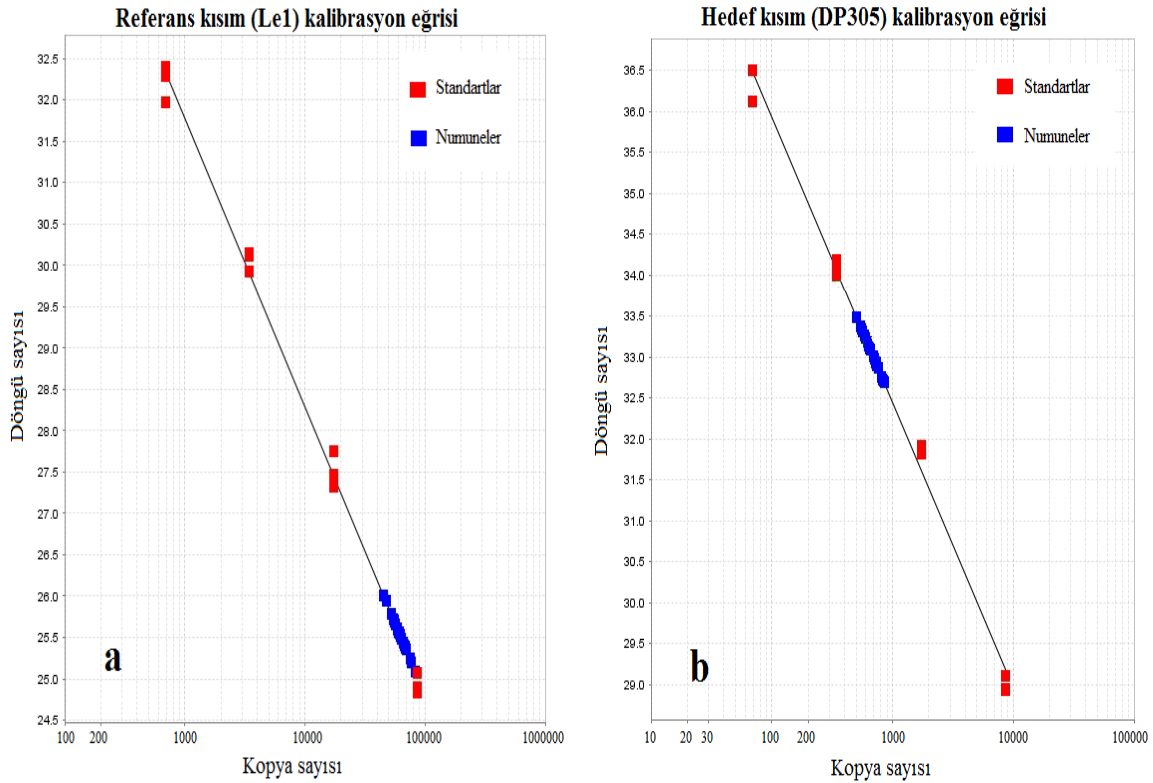
Figure 1. Calibration curves of 10% soybean CRM, a: Reference part, b: Target part.

Kalibrasyon bulguları kabul edilebilir performans kriterleri (eğim ve korelasyon katsayısı) açısından değerlendirildiğinde, Çizelge 3'de görüldüğü gibi soya CRM numunelerinde her iki konsantrasyon düzeyi (%1 ve %10) için de uygun bulunmuştur. Bu kalibrasyona göre yapılan ölçümler sonucunda, Çizelge 4'de görüldüğü gibi %10'luk soya CRM numunesinin 20 dondur-çözdür uygulaması sonucunda %10.6'dan %9.7 düzeyine düştüğü, %1'lik CRM'de ise bu değişimin olmadığı saptanmıştır. Ancak her iki konsantrasyon için de

değişimin istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($P > 0.01$).

Mısır CRM'ine ait %GDO miktar bulguları

Mısır CRM'lerine ait % GDO miktar analizleri sonucunda hesaplanan kalibrasyon eğrileri Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmiştir. Bu kalibrasyon verilerinin kriterlere uygunluğu Çizelge 5'de ve Mısır CRM izolatlarının dondur-çözdür uygulamaları sonrası Real Time PCR'da yapılan % GDO miktar bulguları da Çizelge 6, Şekil 3 ve Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 2. %1'lik Soya CRM'e ait kalibrasyon eğrileri, a: Referans kısım, b: Hedef kısım.

Figure 2. Calibration curves of 1% soybean CRM, a: Reference part, b: Target part.

Çizelge 3. Real Time PCR'da soyaya ait kalibrasyon verileri ve kriterlere uygunluğu

Table 3. Calibration data of soybean in Real Time PCR and compliance with the criteria

%GDO miktarı	Doğrusallık parametreleri	Referans kısım	Hedef kısım	Kriter	Değerlendirme
10	m	-3.13	-3.12	$-3.1 \geq m \geq -3.6$	Uygun
	R ²	0.99	0.99	$R^2 \geq 0.98$	Uygun
1	m	-3.49	-3.48	$-3.1 \geq m \geq -3.6$	Uygun
	R ²	0.99	0.99	$R^2 \geq 0.98$	Uygun

m: Kalibrasyon eğrisine ait eğim, R²: Korelasyon katsayısı

m: Slope of the calibration curve, R²: Correlation coefficient

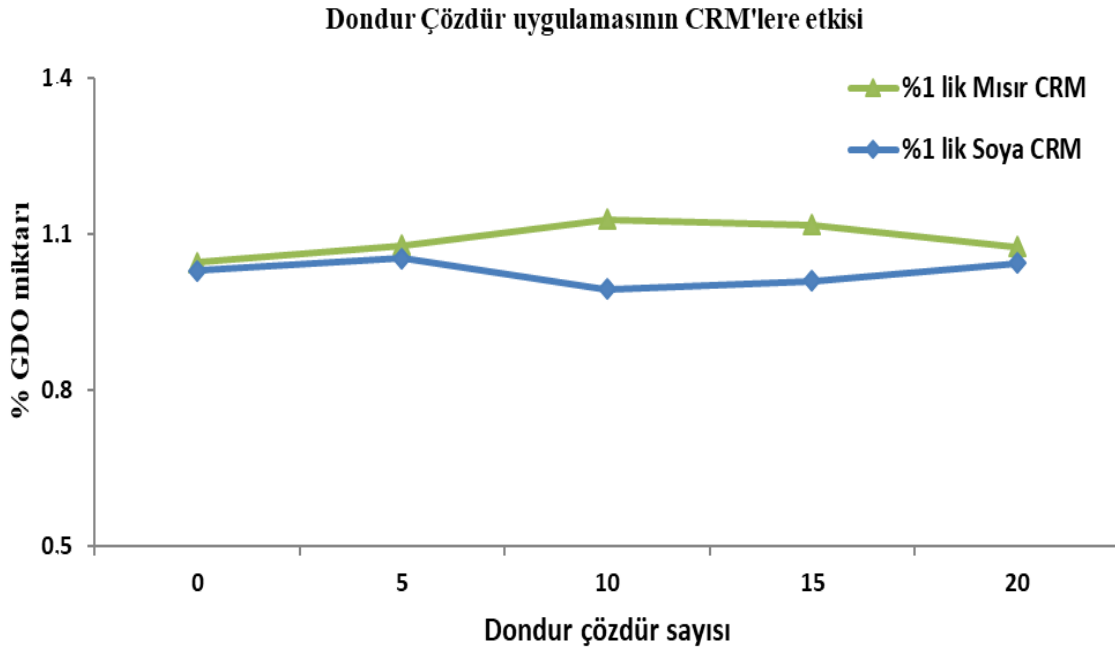
Çizelge 4. Real Time PCR'da soyaya ait %GDO miktar bulguları

Table 4. GMO% content of soybean in Real Time PCR

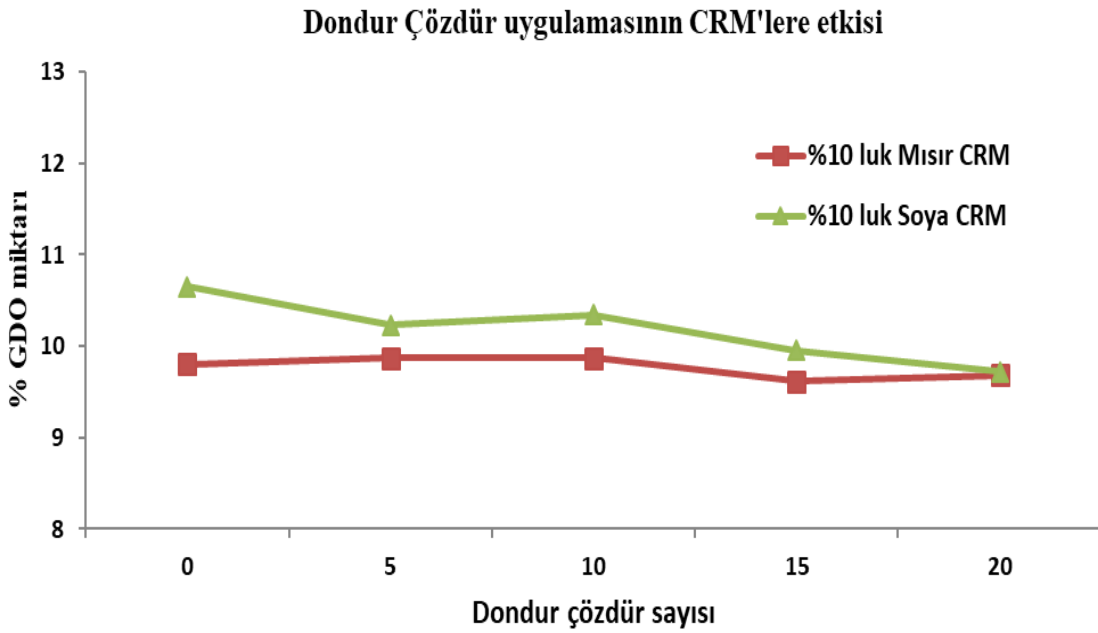
Dondur-çözdür sayısı	n	Soya	
		%10'luk için	%1'lik için
Kontrol	6	10.65±0.29	1.03±0.04
5	6	10.23±0.56	1.05±0.06
10	6	10.34±0.38	0.99±0.07
15	6	9.95±0.68	1.01±0.06
20	6	9.72±0.48	1.04±0.05
Önemlilik derecesi (P >0.01)		Önemsiz	Önemsiz

* Değerler ortalama ± standart sapma (n=6) olarak verilmiştir. (P >0.01).

Values are given as mean ± SD (n=6). (P >0.01).



Şekil 3. %1'lik soya ve mısır CRM'lere dondur-çözdür uygulamasının etkisi.
Figure 3. The effect of freeze-thaw application on 1% soybean and maize CRMs.



Şekil 4. %10'luk soya ve mısır CRM'lere dondur-çözdür uygulamasının etkisi.
Figure 4. The effect of freeze-thaw application on 10% soybean and maize CRMs.

Çizelge 5. Real Time PCR'da mısıra ait kalibrasyon verileri ve kriterlere uygunluğu
Table 5. Calibration data of maize in Real Time PCR and compliance with the criteria

%GDO miktarı	Doğrusallık parametreleri	Referans kısım	Hedef kısım	Kriter	Değerlendirme
10	m	-3.41	-3.31	$-3.1 \geq m \geq -3.6$	Uygun
	R ²	0.99	0.99	$R^2 \geq 0.98$	Uygun
1	m	-3.43	-3.47	$-3.1 \geq m \geq -3.6$	Uygun
	R ²	0.99	0.99	$R^2 \geq 0.98$	Uygun

m: Kalibrasyon eğrisine ait eğim, R²: Korelasyon katsayısı

m: Slope of the calibration curve, R²: Correlation coefficient

Çizelge 6. Real Time PCR'da mısıra ait %GDO miktar bulguları
Table 6. GMO% content of maize in Real Time PCR

Dondur-çözdür sayısı	n	Mısır	
		%10'luk için	%1'lik için
Kontrol	6	9.80±0.50	1.05±0.03
5	6	9.87±0.54	1.08±0.04
10	6	9.87±0.44	1.13±0.04
15	6	9.62±0.29	1.12±0.04
20	6	9.68±0.40	1.08±0.06
Önemlilik derecesi (P >0.01)		Önemsiz	Önemsiz

* Değerler ortalama ± standart sapma (n=6) olarak verilmiştir. (P >0.01).

Values are given as mean ± SD (n=6). (P >0.01).

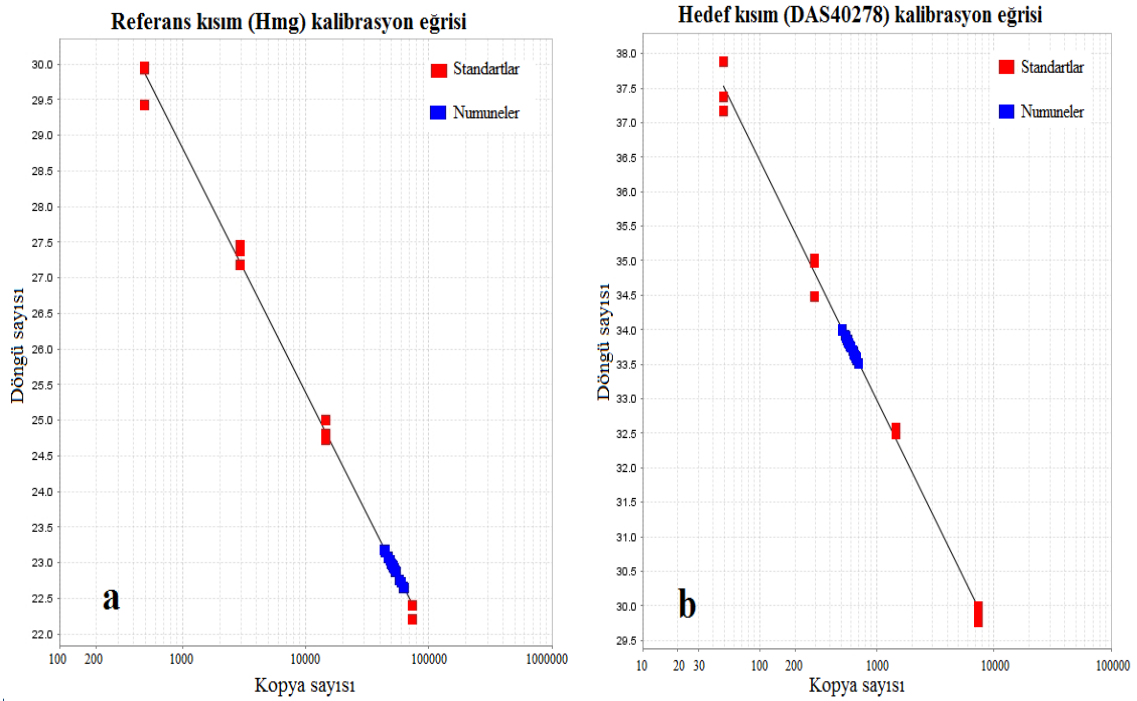
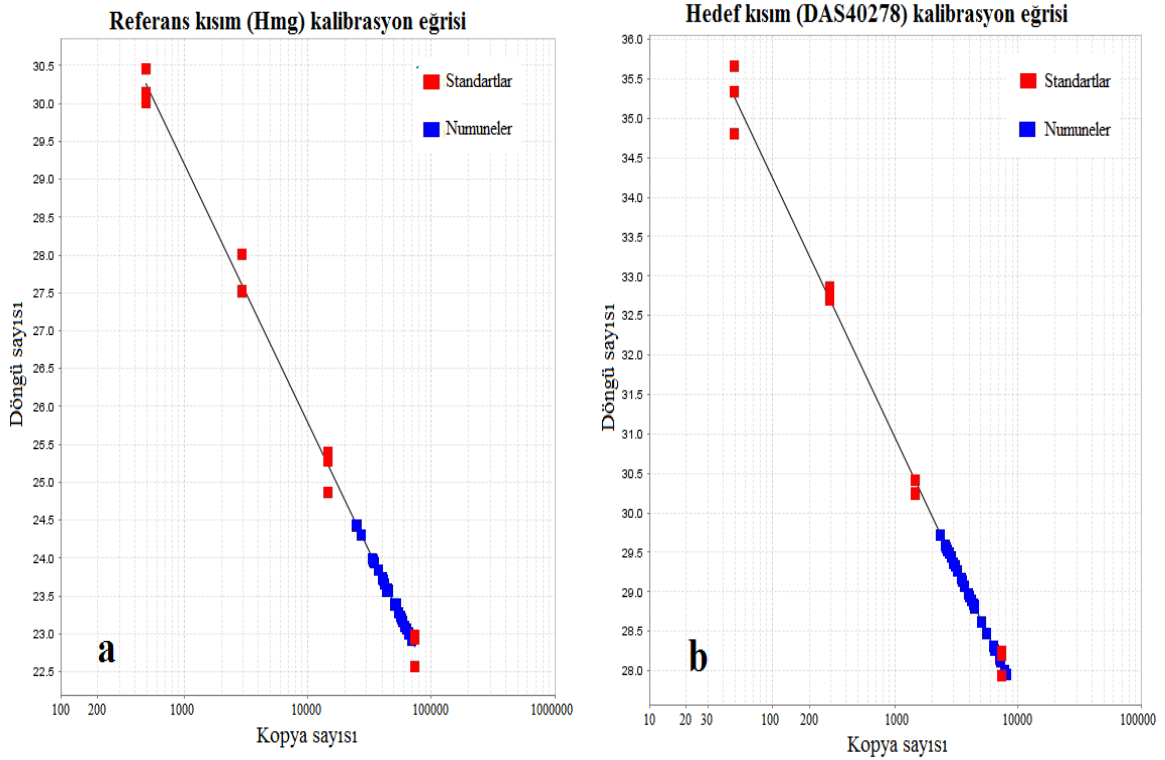
Kalibrasyon bulguları kabul edilebilir performans kriterleri (eğim ve korelasyon katsayısı) açısından değerlendirildiğinde, Çizelge 5'de görüldüğü gibi mısır CRM numunelerinde her iki konsantrasyon düzeyi (%1 ve %10) için de uygun bulunmuştur. Bu kalibrasyona göre yapılan ölçümler sonucunda, Çizelge 6'da görüldüğü gibi mısır CRM numunelerinde 20 dondur-çözdür uygulaması sonucunda her iki konsantrasyon için de değişimin istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür (P > 0.01).

Nükleik asitlerin, dondur-çözdür uygulamasına dayanımı ile ilgili literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde bir çok açıdan farklılıklar (numune kaynağı, matriksi, analiz yöntemi, uygulama parametreleri gibi) içerdiği görülmektedir. Ayrıca DNA ve RNA'nın muhafaza yöntemlerine karşı dayanımlarının da farklı olabileceği göz önüne alındığında çalışmamızda elde edilen bulgular sadece DNA içeren çalışmalar ile kıyaslanabilmektedir. Buna göre;

DNA'nın dondur-çözdür uygulamalarına karşı dayanımı ile ilgili yapılan çalışmalarda, degradasyonun olduğu ile olmadığını gösteren

bulgulara rastlanılmıştır. DNA'nın dondur-çözdür uygulamalarından etkilenmediği benzer sonuçlara Widell vd., 1991; Bellete vd., 2003; Şanlıdağ vd., 2005; Schaudien vd., 2007 ve Fan vd., 2019'un çalışmalarında rastlanmıştır.

DNA, hücre içerisinde molekül olarak kararlı bir yapıya sahip iken izole edildiğinde DNA'nın dış etkenlere (sıcaklık, süre, ışık, pH, kesme kuvveti gibi) karşı dayanımı oldukça azalmaktadır (Gaikwad, 2020; Rice ve Haussler, 2018). Numune izolatlarında yapılmış çalışmalara bakıldığında ise; Schaudien vd. (2007) tarafından, Real Time PCR ile üç farklı DNA standardında ilave muhafaza kimyasalı (gliserol) kullanılarak dondur-çözdür uygulaması yapılmış, su içinde muhafaza edilen standartlarda 4 dondur-çözdür işleminden sonra DNA düzeyinde azalma olduğu, %50 gliserol içerisinde muhafaza edilenlerde ise 16 kez dondurup çözdürmenin bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Gliserol kullanılarak DNA'nın dondur-çözdür uygulamasına dayanabildiği bu çalışmadan farklı olarak çalışmamız, gliserol olmadan da DNA izolatlarının dondur-çözdür uygulamalarına dayanabildiğini göstermiştir.



Farklı çalışma alanlarındaki araştırmacılar tarafından DNA'nın stabilitesi üzerine hangi mekanizmaların nasıl etki ettiği konusu Rossmanith vd. (2010) tarafından yapılan çalışmada açıklanmıştır. Bakteri standardında (*Listeria monocytogenes* ve *Salmonella Typhimurium*'a ait) yapılmış bu çalışmada dondur-çözdür uygulamaları da ele alınmış ve 20 dondur-çözdür sonrasındaki ΔCt değerleri değerlendirilmiştir. Uzun genomik DNA'larda dondurup çözdürmenin etkisi varken, kısa zincirli oligo-nükleotitlerde ise herhangi bir değişimin olmadığı bildirilmiştir. Ct değerlerindeki artışa neden olan mekanizmanın dondur-çözdür sırasındaki buz kesmelerinden kaynaklandığı ileri sürülerek DNA düzeyindeki degradasyon Ct değerleri ile ilişkilendirilmiştir. Kendi çalışmamızda ise standart eğri metodu ile kantitatif bir analiz yapılmış bulgular Ct değerlerinin değişimi olarak değil %GDO değişimi olarak verilmiştir. DNA kaynağının bitkisel standart olmaması, ilave muhafaza kimyasallarının (gliserol, tampon çözelti) kullanılması ve kullanılan analiz metodunun farklı (ΔCt metodu) olması gibi nedenlerle bizim çalışmamızdan farklılık göstermekle beraber dondur-çözdür uygulaması ile DNA'da degradasyonunun meydana gelebileceği de bildirilmiştir.

DNA'nın muhafaza yöntemlerinden dondurmanın enzimatik reaksiyonları inhibe etmesi, böylece oksidatif ve hidrolitik degradasyonu engellemesi sebebiyle muhafazada iyi bir yöntem olduğu bilinmektedir (Bus' ve Allen, 2014). Bu bağlamda çalışmamızda çıkan sonuçlar bu görüşü destekler niteliktedir.

Sonuç olarak; soya ve mısır DNA'larının her iki konsantrasyon (%1 ve %10) düzeyi için 20 dondur-çözdür uygulamasının istatistiksel olarak herhangi bir etkisinin bulunmadığı görülmüştür ($P > 0.01$). Çalışma ile GDO miktar analizi yapan laboratuvarların bu analizlerde her seferinde taze olarak hazırladıkları CRM izolatlarını 20 kez dondur-çözdür döngüsüne kadar DNA degradasyonu olmadan kullanabileceği görülmüştür. Elde edilen bulguların sadece çalışma kapsamında kullanılan bitkiler ve çeşitleri için geçerli olduğunu, bundan sonra yapılacak

çalışmaların diğer bitki spesifik türler ve bunlara ait çeşitler üzerinden doğrulanarak yapılması gerektiği önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı TAGEM/GYKMAE/A/19/A3/P7/01 proje numarası ile maddi olarak destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

AD ve NA araştırmayı tasarladı ve analizleri gerçekleştirdi. AD makaleyi yazdı. MMÇ makalenin son halini okudu ve onayladı.

KAYNAKLAR

Al-Warid, H. S. (2014). The Effect Of Freezing-Thawing On DNA Extraction From *Cryptosporidium* Oocysts In Fecal Samples. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4(1): 14-18.

Anonymous (2003). Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *Official Journal of the European Union*, 18.10.2003-L 268/1.

Anonymous (2009). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-305423-1 Using Real-time PCR. European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Molecular Biology and Genomics Unit.

Anonymous (2010a). Biyogüvenlik kanunu, Kanun numarası: 5997. Tarım ve Orman Bakanlığı, R.G. 26.03.2020-27533.

Anonymous (2010b). Genetik Yapısı Değiştirilmiş Organizmalar Ve Ürünlerine Dair Yönetmelik. Tarım ve Orman Bakanlığı, R.G. 13.08.2010-27671.

Anonymous (2016). Kit for isolation of high-quality DNA from food and feed samples, Eurofins GENESpin. Eurofins GENEScan Technologies GmbH, Germany.

- Anonymous (2018). GDO Analizlerinde Verifikasyon Rehberi. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Nisan 2018, Ankara. https://www.tarimorman.gov.tr/GKGM/Belgeler/DB_Gida_Kont/Verifikasyon_Rehberi_GDO.pdf (Erişim tarihi: 10.10.2020).
- Anonymous (2020a). The International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). <https://www.isaaa.org/kc/cropbiotechupdate/default.asp> (Erişim tarihi: 10.10.2020).
- Anonymous (2020b). Reference materials for GMO analysis. <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/reference-materials-gmo-analysis> (Erişim tarihi: 10.10.2020).
- Belleste, B., Flori, P., Hafid, J., Raberin, H., Tran Manh Sung, R. (2003). Influence of the quantity of nonspecific DNA and repeated freezing and thawing of samples on the quantification of DNA by the Light Cycler. *J Microbiol Methods*, 55: 213–219.
- Brunstein, J., (2015). Freeze-thaw cycles and nucleic acid stability: what's safe for your samples?. <https://www.mlo-online.com/home/article/13008425/freezethaw-cycles-and-nucleic-acid-stability-whats-safe-for-your-samples> (Erişim tarihi: 10.10.2020).
- Bus', M.M., Allen, M. (2014). Collecting and Preserving Biological Samples from Challenging Environments for DNA Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 12(1): 17-22.
- Corbisier, P., Barbante, A., Berben, G., Broothaerts, W., De Loose, M., Emons, H., Georgieva, Tz, Lievens, A., Mazzara, M., Papazova, N., Perri, E., Sowa, S., Stebih, D., Terzi, V., Trapmann, S. (2017). Recommendation for the unit of measurement and the measuring system to report traceable and comparable results expressing GM content in accordance with EU legislation. European Commission Joint Research Centre Technical Reports. ISBN 978-92-79-66971-2, <https://doi.org/10.2760/177516>
- Fan, XJ, Huang, Y, Wu, PH, Yin, XK, Yu, XH, Fu, XH, Feng, LL, Wang, YL, Yi, HJ, Chen, ZT, Yin, JX, Zhang, DL, Feng, WX, Bai, SM, Kim, T, Mills, GB, Lu, YL, Wan, XB, Wang, L. (2019). Impact of cold ischemic time and freeze-thaw cycles on RNA, DNA and protein quality in colorectal cancer tissues biobanking. *Journal of Cancer*, 10(20): 4978-4988, <https://doi.org/10.7150/jca.29372>
- Gaikwad, A.B. (2020). DNA storage methodologies: Principles and Protocols. http://www.nbprg.ernet.in/Portals/6/DMX/GENOMIC_RESOURCES/DNA%20storage%20methods-principles%20and%20protocols.pdf (Erişim tarihi: 10.10.2020).
- Granados, A., Petrich, A., McGeer, A. & Gubbay, J. B. (2017). Measuring influenza RNA quantity after prolonged storage or multiple freeze/thaw cycles. *J Virol Methods*, 247: 45–50.
- Halfon, P., Khiri, H., Gerolami, V., Bourliere, M., Feryn, J. M., Reynier, P., Cartouzou, G. (1996). Impact of various handling and storage conditions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Hepatol*, 25(3): 307-311.
- Lahiri, D. K., Schnabel, B. (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochem Genet*, 31(7-8): 321-328.
- Lee, S. B., Crouse, C. A., Kline, M. C. (2010). Optimizing storage and handling of DNA extracts. *Forensic Science Review*, 22(2): 131-144.
- Mazzara, M., Munaro, B., Grazioli, E., Savini, C., Charles-Delobel, C., Van den Eede, G. (2013). Event-specific Method for the Quantification of Soybean Event DP-305423-1 Using Real-time PCR v. 1.01 - Validation Report and Validated Method. European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection. ISBN 978-92-79-33102-2, <https://doi.org/10.2788/21515>
- Rice, B. J., Haussler, D. (2018). Physical Linkage Preservation in DNA Storage. U.S. Patent Application No: 15/561, 447.
- Ross, K. S., Haites, N. E., Kelly, K. F. (1990). Repeated freezing and thawing of peripheral

- blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J Med Genet*, 27(9): 569-570.
- Rossmann, P., Röder, B., Frühwirth, K., Vogl, C., Wagner, M. (2011). Mechanisms of degradation of DNA standards for calibration function during storage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89(2): 407-417.
- Röder, B., Frühwirth, K., Vogl, C., Wagner, M., Rossmann, P. (2010). Impact of Long-Term Storage on Stability of Standard DNA for Nucleic Acid-Based Methods. *Journal Of Clinical Microbiology*, 48(11): 4260–4262.
- Sanlidag, T., Akcali, S., Ozbakkaloglu, B. (2005). Serum hepatitis B DNA: stability in relation to multiple freeze–thaw procedures. *J Virol Methods*, 123(1): 49-52.
- Savini, C., Bogni, A., Foti, N., Mazzara, M., Kreysa, J. (2012). Event-specific Method for the Quantification of Maize DAS-40278-9 by Real-time PCR – Validation Report and Validated Method. European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection. ISBN 978-92-79-27307-0, <https://doi.org/10.2788/64013>
- Schaudien, D., Baumgärtner, W., Herden, C. (2007). High preservation of DNA standards diluted in 50% glycerol. *Diagn Mol Pathol*, 16(3): 153-157.
- Shao, W., Khin, S., Kopp, W. C. (2012). Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreservation and Biobanking*, 10(1): 4-11.
- Ünal, T.T. (2019). Gıda Ve Yem Ürünlerinde GDO Tespiti İçin Yeterlilik Test Kiti Geliştirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 172 s.
- Widell, A., Månsson, A. S., Sundstrom, G., Hansson, B. G., Nordenfelt, E. (1991). Hepatitis C virus RNA in blood donor sera detected by the polymerase chain reaction: comparison with supplementary hepatitis C antibody assays. *J Med Virol*, 35(4): 253-258.



FARKLI KARBONHİDRAT FORMÜLASYONLARI İLE ÜRETİLMİŞ AYVA SUYU KONSANTRESİ KATKILI SERT ŞEKERLERİN KALİTE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Ahsen Rayman Ergün^{1*}, Yeliz Tekgül²

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

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Köşk Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Aydın, Türkiye

Geliş / Received: 08.02.2021; Kabul / Accepted: 10.03.2021; Online baskı / Published online: 05.04.2021

Rayman-Ergün, A., Tekgül, Y. (2021). Farklı karbonhidrat formülasyonları ile üretilmiş ayva suyu konsantresi katkılı sert şekerlerin kalite özelliklerinin incelenmesi. *GIDA* (2021) 46(3) 528-538 doi: 10.15237/gida. GD21027.

Rayman-Ergün, A., Tekgül, Y. (2021). Investigating the quality characteristics of quince juice concentrate fortified hard candies produced with different carbohydrate formulations. *GIDA* (2021) 46(3) 528-538 doi: 10.15237/gida. GD21027.

ÖZ

Bu çalışmada farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak ayva suyu konsantresi katkılı sert şeker üretimi amaçlanmıştır. Her bir karbonhidrat formülasyonu (%100 sakkaroz, %75 sakkaroz+%25 glikoz, %75 sakkaroz+%25 fruktoz) için geleneksel açık kazan üretim yöntemi kullanılarak sert şeker üretilmiştir. Ürünlerin renk, camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve higroskopisite değerleri, şeker kompozisyonları, duyu özellikleri incelenmiştir. % 100 sakkaroz kullanılarak üretilen sert şekerlerin L^* , a^* ve b^* değerleri en yüksek olarak bulunmuştur. Şeker formülasyonlarına glikoz ve fruktoz ilavesi ürünlerin T_g değerinde azalmaya neden olmuştur. %75 sakkaroz+ %25 fruktoz formülasyonu kullanılarak üretilen sert şekerlerin higroskopisite değeri en yüksek olarak bulunmuştur. Karbonhidrat formülasyonundaki farklılık ürünlerin şeker kompozisyonunu etkilemiştir. Formülasyonunda glikoz içeren sert şekerler genel beğeni kriteri açısından en yüksek puanlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Sert şeker, ayva suyu, şeker kompozisyonu, camsı geçiş sıcaklığı, higroskopisite

INVESTIGATING THE QUALITY CHARACTERISTICS OF QUINCE JUICE CONCENTRATE FORTIFIED HARD CANDIES PRODUCED WITH DIFFERENT CARBOHYDRATE FORMULATIONS

ABSTRACT

In this study, it was aimed to produce hard candy with quince juice concentrate by using different carbohydrate formulations. Hard candy was produced for each carbohydrate formulation (100% sucrose, 75% sucrose + 25% glucose, 75% sucrose + 25% fructose) using the traditional open boiler production method. Color, glass transition temperature (T_g) and hygroscopicity values, sugar composition and sensory properties of the products were examined. The L^* , a^* and b^* values of hard candies produced using 100% sucrose were found to be the highest. Addition of glucose and fructose to sugar formulations caused a decrease in the T_g value of the products. The highest

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: ahsenrayman@hotmail.com,

☎: (+90) 232 311 3042

☎: (+90) 232 311 4831

Ahsen Rayman Ergün; ORCID no: 0000-0003-0943-1950

Yeliz Tekgül; ORCID no: 0000-0001-8173-023X

hygroscopicity value was found in the hard candies produced using 75% sucrose + 25% fructose formulation. The difference in the carbohydrate formulation affected the sugar composition of the products. Hard candies containing glucose in their formulation were scored highest in terms of overall acceptance.

Keywords: Hard candy, quince juice, sugar composition, glass-transition temperature, hygroscopicity.

GİRİŞ

Şekerleme üretimi gıdaların muhafaza edilmesinde kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (Dhakal ve Pradhananga, 2017). Şekerlemeler her yaştan tüketici tarafından sevilerek tüketilen ürün gruplarıdır (Dewi vd., 2017; Güneş vd., 2018; Moura vd., 2019). Tüm dünyada gıda endüstrisinde büyük paya sahip olan şekerleme ürünleri (Tan and Kerr, 2017; Spanemberg vd., 2019), ülkemizde de şekerli ve çikolatalı mamuller sektörü içinde üretilen geleneksel Türk şekerlemeleri üretimine dayanmaktadır (Kuşat ve Kösekahyaoglu, 2011). Şekerleme, şeker ve glikozun ya da yalnızca şekerin pişirilmesi sonrasında sitrik asit, tartarik asit ya da potasyum bitartarat ilavesiyle kestirilme sonucunda oluşan hamura süt, süt tozu, jelatin, yağ ve aroma maddelerinin eklenmesiyle elde edilen gıda maddesidir. Türk Gıda Kodeksine göre şekerlemeler sert şekerleme, yumuşak şekerleme, jöle, draje, tablet şekerler, meyve şekerlemeleri, badem ezmesi ve benzerleri, koz helva, nuga ve benzerleri, fondan, krokan ve dolgulu şekerleme ürünleri olarak sınıflandırılmaktadır. Şekerlemeleri sert ve yumuşak olmak üzere genel olarak iki alt grupta incelemek de mümkündür (Atınok vd., 2020).

Sert şekerler %1'lik bir kısım dışındaki tüm su içeriklerinin ısı ve vakum uygulamasıyla uçurulması sonucunda üretilirler (Hayoğlu vd., 2010). Sert şeker üretiminde katılaşma ve soğutma aşamaları son ürünün kalitesinde büyük önem taşımaktadır (Rheinheimer vd., 2012; Atsukawa vd., 2020). Ayrıca ürünün raf ömrü süresince kalitesi için nem migrasyon oranı ve su içeriği de dikkat edilecek kriterlerdir (Spanemberg vd., 2019). Bir diğer önemli özellik olan camsı geçiş sıcaklığı ile sert şekerlerin dayanıklılığı ölçülmektedir. Yılmaz vd. (2019), şekerin camsı geçiş formunda bulunmasının, ürünün şeffaf ve net bir görünümde olmasını ayrıca sert ve kırılğan yapıya sahip olmasını sağladığını vurgulamıştır.

Camsı geçiş sıcaklığı şekerlemelerin fiziksel özelliklerinin tanımlamada önemli bir faktör olup, camsı yapı amorf bir katı da yarı kristal bir katının amorf bir parçası olarak tanımlanmaktadır. Isıtma sonrasında camsı katının lastiksi bir yapıya dönüştüğü noktaya da camsı geçiş sıcaklığı denilmektedir (Tan ve Kerr, 2017). Sert şekerlerin camsı geçiş sıcaklığının oda sıcaklığının hemen üzerinde olması gerektiğini ve böylelikle parlaklıklarını ve sert yapılarını koruyabilecekleri belirtilmiştir (Ergün vd., 2010), ve şekerin ürün içerisinde kristalleşmemiş (amorf veya şekilsiz) formda olması, şekerlere camsı yapı özelliği vermektedir (Güneş vd., 2018). Camsı geçişin sağlanmasının sakkaroz ve glikoz şurubu gibi modifiye edici ajanlara ve birden soğutmaya bağlı olduğu da bilinmektedir (Smidova vd., 2003).

Şekerlerin bu kalite özelliklerinin korunmasına yönelik olarak son yıllarda yapılan çalışmalarda, şekerlemelerin farklı yararlı bileşiklerce zenginleştirilmesi (Silva vd., 2016; Miranda vd., 2020; Güneş vd. 2018; Palabıyık vd., 2019) dondurma (Archaina vd., 2019) ya da mikrodalgı ile kurutma (Singh vd., 2019) gibi farklı üretim tekniklerinin kullanılması, şeker oranının değiştirilmesi (Mutlu vd., 2018) ve bu ürünlerde kullanılan renklendirici maddeler üzerine yoğunlaşıldığı görülmektedir (Zellner vd., 2018). Güneş vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada bu ürünlerin ürün formülasyonunda besleyici değeri olan veya olmayan tatlandırıcıların yer almasının, çeşitli makro ve mikro elementler, vitaminler ve karotenoidler gibi biyolojik olarak önemli aktif maddelerin bulunmamasının dezavantaj olduğuna değinilmiştir (Dorn vd., 2015). Şekerleme yapımında özellikle sentetik boya maddelerinin kullanımı birçok araştırmada da bahsedildiği üzere çocuklar tarafından albenili olarak karşılanırsa da sağlık üzerinde karsinojenik ve nörotoksik etkilerinin olduğu saptanmıştır (Moura vd. 2019). Bu nedenle doğal renklendiricilere olan ilgi yoğunlaşmış ve hatta doğal renk maddesi

kullanımının son yıllarda % 10-15 oranında arttığı Kovács vd (2019) tarafından bildirilmiştir. Örneğin, Rizk vd. (2008), A vitamini ön maddesi olan karotenoidlerin doğal renk maddesi olarak şekerlemelerde kullanımını araştırmıştır. Kadife çiçeğinden elde ettikleri karotenoid pigmentinin % 0.30 ve/veya % 0.35 oranında katıldığı şekerlerin duyuşal analizde en çok tercih edilen örnek olduğu tespit edilmiştir. Klorofil, antosiyanin, betalain ve karotenoidler doğal renk maddeleri kaynaklarıdır (Rodriguez-Amaya, 2016). Elsanhoty vd., (2017) ise *Rhodotorula mucilaginosa* mayasından karotenoid elde etmiş ve şekerlemede kullanmıştır. Özyurt vd. (2019), şeker pancarından betalain ekstraktlarının şekerleme yapımında kullanımına değinmiştir. Bir başka çalışmada ise, Dewi vd. (2018), Spirulina bitkisinden elde ettiği antioksidan zengin doğal mavi renk maddesi olan fikosiyani, brillant mavi adıyla bilinen sentetik boyaya alternatif olarak jelly tipi şekerleme üretiminde enkapsüle ederek kullanmıştır. Ayrıca fikosiyani, kek dekorasyonunda kullanılan şekerli içecekler, sakızlar, buzlu şekerler gibi şekerleme çeşitleri için Japonya'da ticari olarak da üretilip kullanıldığı belirtilmiştir (Yılmaz vd., 2016). Nesreen vd. (2017), havuç ve çilek gibi doğal renk maddeleri ile yüksek C vitamini ve antosiyanin içeriğine bağlı olarak daha sağlıklı ve daha dikkat çekici renkte ürün üretilebileceğini vurgulamış ve yaptıkları çalışmada marshmallow tipi yumuşak şekerlerde doğal kırmızı ve sarı renk sırasıyla pancar ve altın çilek suyundan sağlanmıştır. Meyve suyu konsantreleri ile üretilen şekerlemelerin doğal renk maddeleri sağlamlasının yanında antioksidan aktivite ve mineral maddece zengin olmaları açısından da tercih edilmesi gereken kaynaklar olduğu sonucuna varılmaktadır.

Ayva suyu askorbik asit, fenolik maddeler, flavanoidler, hisroksisiamik asit gibi biyoaktif bileşenlerce zengin olması ile dikkat çekmektedir (Wojdyto vd., 2014; Yıkılmış vd., 2019). Bu çalışmada ayva suyu konsantresi ile zenginleştirilmiş, farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen sert şekerlerin renk, higroskopisite, camsı geçiş ve duyuşal özellikleri ile şeker bileşenleri açısından kıyaslanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Üretimde sakkaroz (Torcu Konya Şeker Sanayi ve Ticaret A.Ş., Konya, Türkiye), glikoz şurubu (75 °Bx), fruktoz ve sitrik asit (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Ayva suyu konsantresi (70.50°Bx, 3.75 pH) Tunay Gıda A.Ş (Erzincan, Türkiye)'den satın alınmıştır.

Yöntem

Üretim Yöntemi

Çalışmada her bir karbonhidrat formülasyonu (%100 sakkaroz, %75 sakkaroz+%25 glikoz, %75 sakkaroz+%25 fruktoz) için ayva suyu konsantresi kullanılarak geleneksel açık kazan üretim yöntemi ile sert şeker üretilmiştir. 200 gr sakkarozun 200 mL suda çözünmesi sağlanmış ardından kaynama noktasına ulaşan suya 5 mL sitrik asit (% 5' lik çözelti haline) ilave edilmiştir. Sürekli karıştırarak şeker miktarının % 10.25'i kadar glikoz şurubu eklenmiştir. Kazanda kaynama noktası 100°C'nin üstüne ulaşınca 102°C±1 soğutma aşamasına geçilmiştir. Pişirme süresince kazan içi karışım sıcaklığı data logger (IOtech Inc., Cleveland, OH, USA) ile ölçülmüştür. Üretimler esnasında suda çözünür kuru madde miktarı dijital refraktometre (MA871, Hanna Instruments Ltd, UK) ile ölçülmüştür. Karışım sıcaklığı 85°C'ye ulaştığında renk vermek amacıyla doğal meyve suyu konsantresi (1 mg/100 gr) eklenmiştir. Şekerleme kesilme sıcaklığına kadar soğutulmak amaçlı karışım soğuk mermer üzerine dökülerek 25°C'ye soğutulmuştur. Kesme ile şekil verilerek 3.00±0.50 ve 1.50±0.20 cm boyutlarında şeker elde edilmiştir. Sert şekerler nemsiz ortamda analiz edilinceye kadar bekletilmiştir.

Analiz Yöntemleri

Renk Analizi

Şeker örneklerinin renk değerleri (L^* , a^* ve b^*) kolorimetre (CR-10, Konica Minolta, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. C^* (renk yoğunluğu) ve h° (renk tonu) değerlerini belirlemek üzere aşağıdaki formülasyonlar (1 ve 2) kullanılmıştır.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (1)$$

$$h^\circ = \arctan (b^*/a^*) \quad (2)$$

Camsı Geçiş Sıcaklığı

Örneklerin camsı geçiş sıcaklığı analizi DSC cihazı (Perkin Elmer DSC 8000) ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler toz haline getirilip alüminyum örnek kaplarına tartılmış ve hermetik olarak kapatılmıştır. İşlem öncesi oda sıcaklığında 30 dk bekletilmiştir. Cihaz referans olarak kullanılan boş alüminyum pan ile kalibre edilmiştir. Örnekler 5 °C/dk ısıtma hızıyla -40 °C'den 120 °C'ye kadar ısıtılarak termogramlar elde edilmiştir. Camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) ölçülmüştür (Smidova vd., 2003).

Higroskopisite

Örneklerin higroskopisite değerleri Cai ve Corke (2000)'ye göre belirlenmiştir. Bu amaçla 5 g örnek, tabanında %75.3'lük doymuş NaCl çözeltisi bulunan desikatör içerisine yerleştirilmiştir. Örnekler 25 °C'de desikatör içinde bir hafta süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda tartım alınmış ve Eşitlik 3'e göre hesaplama yapılmıştır.

$$\text{Higroskopisite} = [(T_2 - T_1) / T_1] \times 100 \quad (3)$$

T₁=İlk tartım ağırlığı (g)

T₂=Son tartım ağırlığı (g)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Şeker Bileşenleri Analizi

Örneklerin şeker bileşenleri yüksek basınç sıvı kromatografisi ve refraktif index dedektörü (HPLC-RI, Dionex Bio LC 40001) kullanılarak belirlenmiştir. 10 g örnek 50 ml %25 EtOH ile karıştırılarak elde edilen çözelti 0.45 µm gözenek çaplı PVDF (polyvinylidene fluoride) filtreden geçirilmiş ve cihaza verilmiştir. Mobil faz olarak deiyonize su kullanılmış, akış hızı 0.6 ml/dk ve kolon sıcaklığı 80 °C olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 10.0 µl olarak belirlenmiştir. Analizler Aminex HPX-87P karbonhidrat kolonu (300×7.8 mm ID) ile gerçekleştirilmiştir (Rupérez and Toledano, 2003).

Duyusal Analiz

Ayva suyu konsantresi ile üretilmiş sert şekerler 18 eğitimli panelist tarafından görünüm, tekstür, lezzet ve genel beğeni kriterleri bakımından değerlendirilmiştir. Tüm numuneler oda sıcaklığında ve normal aydınlatma koşullarında rastgele üç haneli sayılarla kodlu olarak sunulmuştur. Panelistler örnekleri 9 puanlık

hedonik bir ölçekte (9=aşırı çok beğendim, 8=çok beğendim, 7=orta derecede beğendim, 6=az beğendim, 5=ne beğendim ne beğenmedim, 4=az derecede beğenmedim, 3=orta derecede beğenmedim, 2=beğenmedim, 1=hiç beğenmedim) puanlamıştır. Panelistlerden elde edilen veriler toplanmış, ortalama değerler ve standart sapmalar belirlenmiştir (Altuğ ve Elmacı 2005).

İstatistiksel değerlendirme

% 95 güven aralığında varyans analizinden (ANOVA) yararlanılarak SPSS istatistiksel paket programı ile (SPSS 15.0 Windows Version; SPSS Inc., Chicago, Ill) istatistiksel değerlendirme yapılmıştır.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Sert Şekerlerin Renk Değerleri

Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerlerin renk değerleri Çizelge 1'de, sert şekerlerin görselleri ise Şekil 1'de sunulmuştur. %100 sakkaroz kullanılarak üretilen şekerlerin L* değerinin diğer formülasyonlar kullanılarak üretilenlere kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Sert şeker üretiminde formülasyonlarda farklı karbonhidrat kullanımının ürünlerin parlaklıklarını üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P < 0.05). Formülasyonunda %25 fruktoz içeren sert şekerlerin a* ve b* değerleri en düşük olarak bulunmuştur. Formülasyonunda %25 fruktoz içeren sert şekerler ile formülasyonunda %25 glikoz içeren sert şekerlerin a*, b*, C* ve h° değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P > 0.05). Yalnızca sakkaroz kullanılarak üretilen sert şekerlerin C* değerinin en yüksek, h° değerinin ise en düşük olduğu bulgulanmıştır. Formülasyonunda %25 glikoz kullanılarak üretilen sert şekerlerin h° değeri en yüksek olup panelistlerce yapılan değerlendirmede görünüm kriteri açısından diğer gruplara kıyasla en fazla puanı almıştır. %100 sakkaroz kullanılarak üretilen sert şekerler ile formülasyonunda %25 glikoz içeren sert şekerlerin h° değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P < 0.05). %100 sakkaroz kullanılarak üretilen sert şekerler ile

formülasyonunda %25 fruktoz içeren sert şekerlerin h° değerleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemsizdir ($P>0.05$).

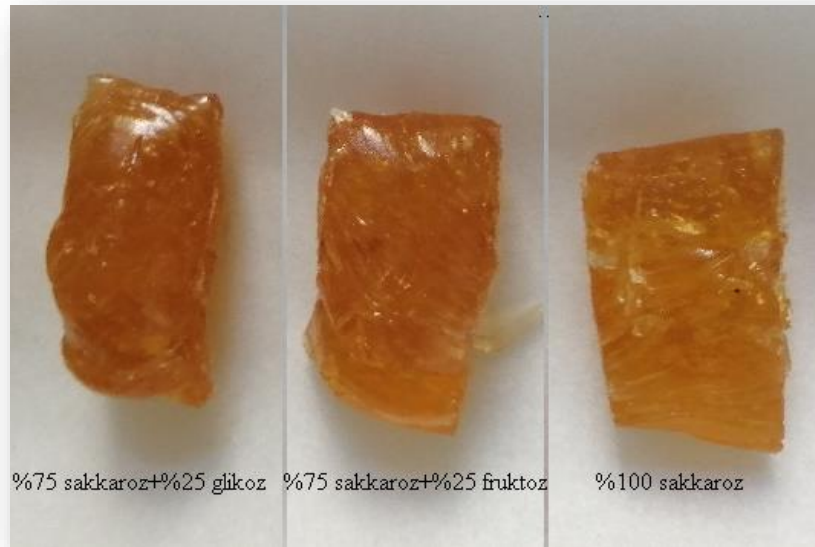
Çizelge 1. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerlerin renk değerleri

Table 1. Color values of hard candies with quince concentrate produced with different carbohydrate formulations

Örnek Sample	L^*	a^*	b^*	C^*	h°
%100 sakkaroz	28.19±0.31 ^a	4.25±0.92 ^a	20.22±1.05 ^a	20.66±0.18 ^a	78.13±0.38 ^a
%75 sakkaroz +%25 glikoz	21.19±1.01 ^b	1.73±0.07 ^b	12.53±0.46 ^b	12.65±0.46 ^b	82.15±0.08 ^b
%75 sakkaroz +%25 fruktoz	25.19±1.32 ^c	1.67±0.17 ^b	9.11±0.84 ^b	9.26±0.85 ^b	79.63±0.60 ^{a,b}

(^{a-c}) Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$)

(^{a-c}) Different letters in the same column indicate statistical differences ($P<0.05$)



Şekil 1. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerler
Figure1. Hard candies with quince concentrate produced with different carbohydrate formulations

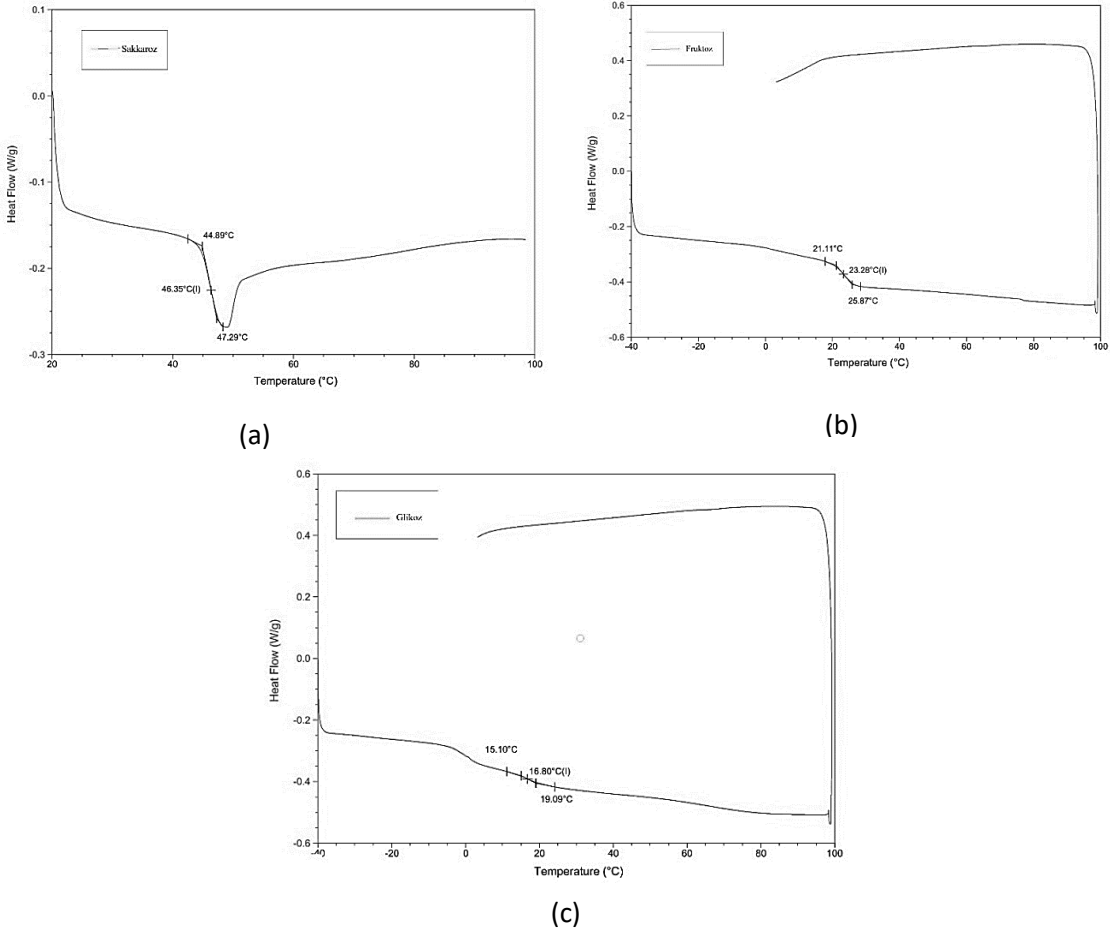
Sert Şekerlerin Camsı Geçiş Sıcaklıkları

Amorf bileşen içeren gıdalar camsı geçiş sıcaklıklarının (T_g) üzerindeki sıcaklıklarda muhafaza edildiklerinde moleküllerdeki mobilite artmakta ve bozulmalar hızlanmaktadır (Kılıç ve Evranuz, 2006). Camsı geçiş sıcaklığı, sert şekerler gibi amorf bileşenler içeren ürünlerin dayanıklılıkları üzerine etki eden bir parametredir. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak

üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerlerin DSC termogramları Şekil 2'de sunulmuştur. Şekil 2 incelendiğinde farklı karbonhidrat formülasyonlarının ürünlerin T_g değerlerinde değişikliklere neden olduğu görülmektedir. %100 sakkaroz kullanılarak hazırlanan şekerlerin T_g değeri 46.35 °C olarak bulunmuştur. %75 sakkaroz+%25 fruktoz formülasyonu kullanılarak hazırlanan şekerler için T_g 23.28 °C olarak

bulgulanmıştır. Glikoz ilave edilerek hazırlanan şekerlerin T_g değerleri en küçük olup $16.8\text{ }^\circ\text{C}$ 'dir. Sert şeker üretiminde glikoz ve fruktoz kullanımının ürünlerin T_g değerlerinde azalmaya neden olduğu görülmektedir. Benzer şekilde,

Yılmaz vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada sert şeker üretiminde sakkarozla glikoz ve sorbitol ilavesinin ürünlerin T_g değerinde düşüşe neden olduğu saptanmıştır.



Şekil 2. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerlerin DSC termogramları ((a):%100 sakkaroz, (b):%75 sakkaroz+%25 fruktoz, (c):%75 sakkaroz+%25 glikoz)

Figure 2. DSC thermograms of hard candies with quince concentrate produced with different carbohydrate formulations ((a):%100 sucrose, (b):%75 sucrose+%25 fructose, (c):%75 sucrose+%25 glucose)

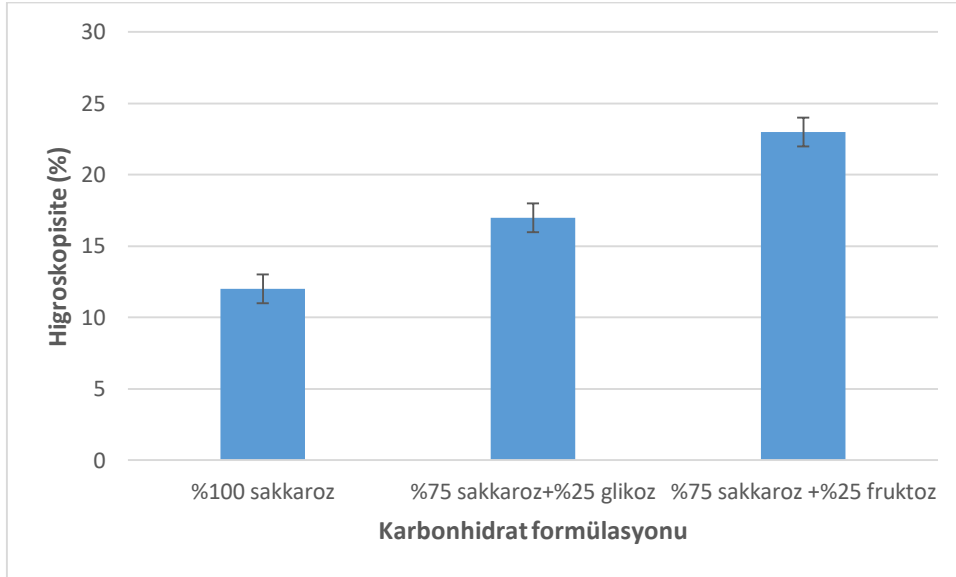
Sert Şekerlerin Higroskopisite Değerleri

Higroskopi, denge nem miktarından daha yüksek bağıl neme sahip koşullarda, gıdaların su tutma yeteneği olup ürünlerin depolama koşullarına etki etmektedir (Oliveira vd., 2014). Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva suyu konsantresi katkılı sert şekerlerin higroskopisite değerleri Şekil 3'de gösterilmektedir. Şekli 3 incelendiğinde farklı

karbonhidrat kullanımının ürünlerin higroskopisite değerlerine etki ettiği görülmektedir. % 100 sakkaroz kullanılarak üretilen sert şekerlerin higroskopisite değeri en düşük, %75 sakkaroz+%25 fruktoz formülasyonu kullanılarak üretilen sert şekerlerin higroskopisite değeri ise en yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde Sokolovsky (1937) tarafından yapılan bir çalışmada şeker örnekleri %98,8 relatif neme

sahip bir desikatörde 40 gün bekletilmiş, fruktoz içeren örneklerin kütlece glikoz ve sakkaroz içeren örneklere kıyasla daha fazla nem absorbe ettiği saptanmıştır. İlaslan (2014) tarafından yapılan, farklı oranlarda sakkaroz ve glikoz içeren sert

şekerlerin incelendiği bir çalışmada ürünlerdeki sakkaroz oranı artışının nem absorpsiyon yüzdesini düşürdüğü belirlenmiştir.



Şekil 3. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerlerin higroskopisite değerleri

Figure 3. Hygroscopicity values of hard candies with quince concentrate produced with different carbohydrate formulations

Sert Şekerlerin Şeker Bileşenleri

Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva suyu konsantresi katkılı sert şekerlerin şeker bileşenleri analiz sonuçları Çizelge 2'de sunulmuştur. HPLC ile gerçekleştirilen analizde örneklerde fruktoz, glikoz ve sakkaroz

tespit edilirken maltoz tespit edilememiştir. Fruktoz, glikoz ve sakkaroz için alıkonma süresi sırasıyla 5.8, 6.5 ve 9.5 dk olarak belirlenmiştir. Örneklere ait analiz sonuçlarını gösteren HPLC kromatogramlarından biri Şekil 4'de gösterilmektedir.

Çizelge 2. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerlerin şeker bileşenleri

Table 2. Sugar compositions of hard candies with quince concentrate produced with different carbohydrate formulations

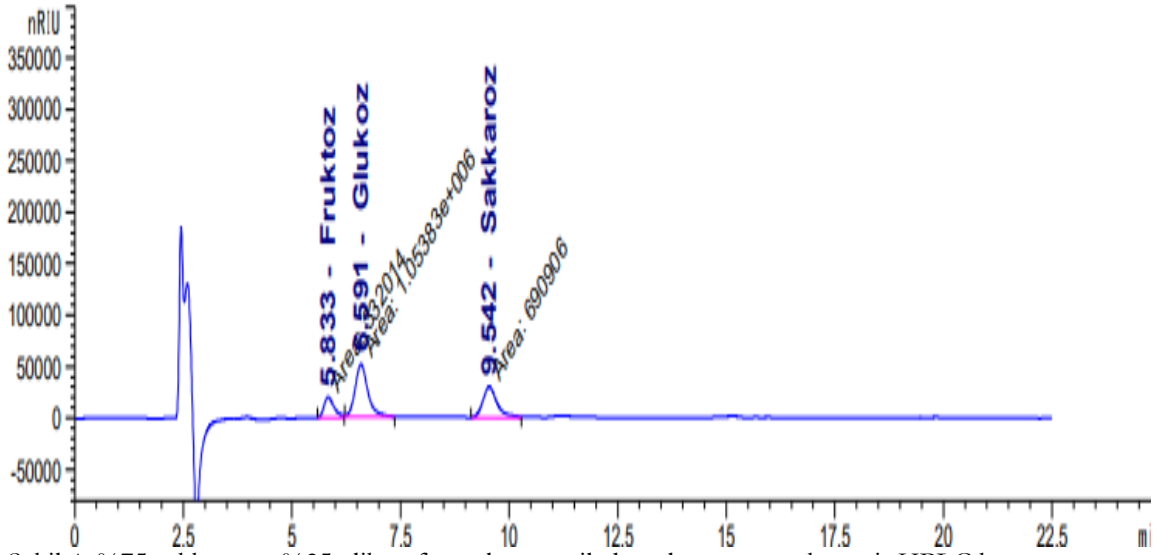
Örnek	Fruktoz (g/100 g)	Glikoz (g/100 g)	Sakkaroz (g/100 g)	Maltoz (g/100 g)
Sample	Fructose (g/100 g)	Glucose (g/100 g)	Sucrose (g/100 g)	Maltose (g/100g)
%100 sakkaroz	4.16±0.32 ^a	5.37±0.65 ^a	73.53±0.08 ^a	n.d.
%75 sakkaroz+%25 fruktoz	15.71±0.07 ^b	20.02±0.24 ^b	31.22±0.10 ^b	n.d.
%75 sakkaroz+%25 glikoz	11.85±0.13 ^c	33.97±0.06 ^c	23.40±0.50 ^c	n.d.

(^{a-c}) Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$)

n.d.: tespit edilemedi

(^{a-c}) Different letters in the same column indicate statistical differences ($P<0.05$)

n.d.: not detected



Şekil 4. %75 sakkaroz+ %25 glikoz formülasyonu ile hazırlanan sert şekerle ait HPLC kromatogramı
Figure 4. HPLC chromatogram of hard candy produced with %75 sucrose+ %25 glucose formulations

Glikoz, fruktoz, sakkaroz ve glikoz ya da maltoz şurubundan oluşan camsı yapıdaki amorf ürünler sert şeker olarak adlandırılmaktadır (Smidova vd., 2003). Sert şekerlerde tatlılığı arttırmak amacıyla formülasyonlara invert şeker ilavesi yapılabilmektedir (Sabbagh vd., 1979). İner şeker, sakkarozun sıcaklık ve asit etkisiyle inversiyona uğraması sonucu açığa çıkan, glikoz ve fruktoz içeren bir üründür (Smidova vd., 2003). Çizelge 2'de yer alan sonuçlar incelendiğinde %100 sakkaroz kullanılarak üretilen şekerlerde inversiyon sonucu glikoz ve fruktozun açığa çıktığı görülmektedir. Formülasyonunda %25 fruktoz yer alan şekerlerin sakkaroz içeriklerinin formülasyonunda %25 glikoz yer alan şekerlerinkine kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, %75 sakkaroz+%25 glikoz formülasyonu kullanılarak üretilen şekerlerde inversiyon hızının daha yüksek olması ile açıklanabilir.

Duyusal Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Farklı karbonhidrat formülasyonları ile üretilmiş ayva suyu konsantresi katkılı sert şekerlere ait duyusal analiz sonuçları Çizelge 3'de yer almaktadır. Panelistler tarafından sert şekerler görünüm kriteri açısından değerlendirildiğinde %75 sakkaroz+%25 glikoz formülasyonu ile üretilenler en yüksek puanı alırken %100 sakkaroz

kullanılarak üretilenler ise en düşük puanı almıştır. Tekstürel olarak en beğenilen ürün %75 sakkaroz+%25 glikoz formülasyonu kullanılarak üretilen şekerlemeler olmuştur. %75 sakkaroz+%25 fruktoz ve %100 sakkaroz formülasyonları kullanılarak elde edilen sert şekerlerde camsı amorf yapı %75 sakkaroz+%25 glikoz formülasyonunun kullanıldığı şekerlere kıyasla hızla bozduğundan şekerler tekstür kriteri açısından daha düşük puanlanmıştır. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilmiş sert şekerlerin lezzet kriteri açısından puanları incelendiğinde puanlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Lezzet kriteri açısından en yüksek puanı glikoz içeren grubun oluşturduğu görülmüştür. Benzer şekilde genel beğeni açısından en yüksek puanı %75 sakkaroz+%25 glikoz formülasyonu kullanılarak hazırlanmış şekerlemeler almıştır. Sakkarozun %100 olarak kullanıldığı ve fruktozun yer aldığı formülasyonların genel beğeni puanları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$).

Çizelge 3. Farklı karbonhidrat formülasyonları kullanılarak üretilen ayva konsantresi katkılı sert şekerlerin duyu analizi sonuçları

Table 3. Sensory analysis results of hard candies with quince concentrate produced with different carbohydrate formulations

Örnek	Görünüm	Tekstür	Lezzet	Genel beğeni
Sample	Appearance	Texture	Flavour	Overall acceptance
%100 sakkaroz	7.11±1.36 ^a	6.89±1.04 ^a	7.22±0.97 ^a	7.88±0.93 ^a
%75 sakkaroz+%25 fruktoz	7.88±0.78 ^b	5.66±1.42 ^b	7.11±1.16 ^a	7.67±1.00 ^a
%75 sakkaroz+%25 glikoz	8.22±0.97 ^c	7.88±1.05 ^c	7.56±0.73 ^a	8.22±1.30 ^b

(^{a-c}) Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$)

(^{a-c}) Different letters in the same column indicate statistical differences ($P<0.05$)

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Ahsen RAYMAN ERGÜN, araştırmanın planlanması, üretimin gerçekleştirilmesi, analizlerin takibi, değerlendirilmesi ve makalenin yazımını sağlamıştır. Yeliz TEKGÜL, araştırmanın planlanması, üretimin ve analizlerin gerçekleştirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve makalenin yazımını sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamışlardır.

KAYNAKLAR

Altınok, E., Palabiyik, I., Gunes, R., Toker, O.S., Konar, N., Kurultay, Ş. (2020). Valorisation of grapeby-products as a bulking agent in soft candies: Effect of particle size. *LWT-Food Sci Technol*, 118108776.

Altuğ Onoğur, T., Elmacı, Y. (2011). *Sensory evaluation in foods*. İzmir, Turkey: Sidas.

Archaina, D., Sosaa, N., Riveroa, R., Scheborb, C. (2019). Freeze-dried candies from black currant (*Ribesnigrum*L.) and yoghurt. Physicochemical and sensorial characterization. *LWT-Food Sci Technol*, 100: 444-449.

Atsukawa, K., Kudo, S., Amari, S., Takiyama, H. (2020). Increase of solidification rate to improve quality of productivity for xylitol/ sorbitol crystalline candy products. *J. Food Eng*, 268: 109738.

Cai, Y.Z., Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus P-cunanan pigments. *Ö. Food Sci*, 65:1248-1252

Dewi, E.N., Kurniasih, R.A., and Purnamayati, L. (2018). The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of jelly candy. 3rd International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development 2017 IOP Publishing IOP Conf. Series: *Earth and Environmental Science*, 116: 012047.

Dhokal, D. and Pradhananga, M.L. (2017). Utilization of watermelon rind (byproduct) in preparation of candy and its quality evaluation. *Int Multidiscip Res J*, 2 (1): 1-6.

Dorn, G.A., Savenkova, T.V., Sidorova, O.S., Golub, O.V. (2015). Confectionery goods for healthy diet. *Foods Raw Mater*, 3(1): 70-76.

Elsanhoty, R.M. Al-Turki A.L., El-Razik, M.M.A. (2017). Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa* and their applications as colorant agent in sweet candy. *J Food Agric Environ*, 15 (2): 21-26.

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

Güneş, R., Palabiyik, İ., Kurultay, Ş. (2018). Şekerleme teknolojisinde fonksiyonel ürün üretimi. *Gıda*, 43 (6): 984-1001.

Hayoğlu, I., İzol, G., Gümüş, A., Göncü, B., Çevik, G.B. (2010). Menengicin şekerleme

- üretiminde kullanım olanakları. *J. Agric Fac Hr U*, 14(4): 57-62.
- İlaslan, K. (2014). Sert şekerlemelerde kontrolsüz inversiyon ve soğuk erime problemlerinin araştırılması ve çözüm önerileri. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye, 84 s.
- Kılıç, M., Evranuz, Ö. (2006). Gıdalarda camsılığa geçiş ve kalite ilişkisi. *Gıda*, 31(5):253-257.
- Kovács, M., Dóka, O., Richfield D. (2019). Determination of two color agents in hard boiled candy by laser-based photoacoustic spectroscopy and colorimetry carpathian. *J of Food Sci Technol*, 11(4): 126-132.
- Kuşat, N., Kösekahyaoglu, L. (2011). Gıda sektöründe ürün ve iyileştirilmiş ürün inovasyonları: Batı Akdeniz bölgesi şekerleme, kakao ve çikolata alt sektörü üzerine bir uygulama. *Uluslar Alanya İşletme Fak Derg*, 3: 2.
- Mirandaa, J.S., Costa, B.V., de Oliveira, I.V., de Lima, D.C.N., Martins, E.M.F., Júnior, B.R.C.L., Benevenuto, W.C.A.N., de Queiroza, I.C., da Silvaa, R.R., Martins, M.L. (2020). Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. *LWT-Food Sci Technol*, 126: 109275.
- Moura, S.C.S.R., Berling, C.L., Garcia, A.O., Queiroz, M.B., Alvim, I.D., Hubinger, M.D. (2019). Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. *Food Res Int*, 121:542–552.
- Mutlu, C., Tontul, S.A., Erbaş, M. (2018). Production of a minimally processed jelly candy for children using honey instead of sugar. *Food Sci Technol*, 93: 499-505.
- Nesreen, M., El.Said Ali, N.M., Al-Askalany, S. A., Ghandor, H.M. (2017). Evaluation of sensory, physicochemical changes of marshmallow (children candy) by addition natural colors. *Bull of the Nalt Nutr Inst of the Arab Republic of Egypt*, (50):154-178.
- Oliveira, G.A., Castilhos, F., Renard, C.M.C., Bureau, S. (2014). Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. *Food Res Int*, 60:154-162.
- Özen, G., Akbulut, M., Artık, N. (2011). Stability of black carrot anthocyanins in the Turkish delight (LOKUM) during storage. *J. Food Process Eng*, 34(4):1282-1297.
- Özyurt, V.H., Saralı, H., Ötleş, S. (2019). Betalain ekstraktlarının gıdalarda kullanım olanakları. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg*, 25(7), 864-870.
- Palabıyık, İ. Demircan, A., Demirci, A. Ş. (2019). İnülin içerikli jelly tipi yumuşak şekerleme üretimi ve bileşen optimizasyonu. *Gıda*, 44 (5): 759–769.
- Reinheimer, M.A., Mussati, S.F., Scenna, N.J. (2012). Optimization of operating conditions of a cooling tunnel for production of hard candies. *J. Food Eng*, 109(1): 22-31.
- Rizk, E.M., El-Gharably, A.M., Tolba, K.H. (2008). carotenoid pigments composition of calendula flower and its potential uses as antioxidant and natural colorant in manufacturing of hard candy. *Agric Sci Ain Shams Univ, Cairo*, 16(2): 407-417.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Curr Opin Food Sci*, 7: 20-26.
- Rupérez, P., Toledano, G. (2003). Celery byproducts as a source of mannitol. *Eur Food Res Technol*, 216(3): 224–226
- Sabbagh, N.K., Fagerson, I.S. (1979). Changes in carbohydrate composition in Hard Candy. *J. Food Sci*, 44, 123-126.
- Silva, L.B., Annetta, F.E., Alves, A.B., Queiroz, M.B.Q., Fadini, A. L., Silva, M.G., Efraim, P. (2016). Effect of differently processed açai (*Euterpe oleracea* Mart.) on the retention of phenolics and anthocyanins in chewy candies. *Int J. Food Sci Technol*, 51: 2603–2612.
- Singh, C., Saluja, N., Sharma, R. K., (2019). A computation-driven, energy-efficient and hybrid of microwave and conventional drying process for fast gooseberry candy production. *J. Microw Power Electromagn Energy*, 53(4): 259-275.

- Smidova, I., Copikova, J., Maryska, M., Coimbra, A. (2003). Crystals in hard candies. *Czech J. Food Sci*, 21(5): 185-191.
- Sokolovsky, A. (1937). Effect of humidity on hygroscopic properties of sugars and caramel. *Ind Eng Chem*, 9: 1422-1423..
- Spanemberg, F.E.M., Korzenowski, A.L., Sellitto, M A. (2019). Effects of sugar composition on shelf life of hard candy: Optimization study using D-optimal mixture design of experiments. *J. Food Process Eng*, 42:13213.
- Tan, J., Kerr, W.L. (2017). Determination of glass transitions in boiled candies by capacitance based thermal analysis (CTA) and genetic algorithm (GA). *J. Food Eng*, 193: 68-75.
- Wojdyło, A., MiroslawaTeleszko, M., Oszmiański, J. (2014). Antioxidant property and storage stability of quince juice phenolic compounds. *Food Chem*, 152: 261-270.
- Yıkılmış, S., Çöl, B.G., Alpaslan, M. (2019). Thermosonication processing of quince (*Cydonia Oblonga*) juice: Effects on total phenolics, ascorbic acid, antioxidant capacity, color and sensory properties. *Cienc. Agrotec*, 43:e019919.
- Yılmaz, F.M., Yıldırım, E., Karakuş, M. (2019). Production of natural colorant fortified hard candy: Effects of different carbohydrate formulations on colour, glass transition, hygroscopicity, carbohydrate composition and sensory properties. *Gıda*, 44 (2): 357-368.
- Yılmaz, H.K., Dikbaş, M.D., Bilgüven, M. (2016). Siyanobakterilerden elde edilen pigment maddeleri ve kullanım alanları. *Bursa Uludağ Üni. Ziraat Fak. Derg.* 30(1): 139-155.
- Zellner, D., Greene, N., Jimenez, M., Calderon, A., Diaz, Y., Sheraton, M. (2018). The effect of wrapper color on candy flavor expectations and perceptions. *Food Qual Prefer*, 68: 98-104.



HAVUÇ ÇİPSİNDE İDEAL ÜRETİM PARAMETRELERİNİN BELİRLENMESİ

Sabri Akbalık^{1*}, Rasim Alper Oral², Adnan Fatih Dağdelen², Emine Alkın¹, Nagihan Uğur¹, Bayram Davarcı¹, Ayşe Binnur Karataş¹, Mehmet Sağlam¹

¹ Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Yem Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Bursa, Türkiye

² Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bursa, Türkiye

Geliş / *Received*: 17.12.2020; Kabul / *Accepted*: 09.03.2021; Online baskı / *Published online*: 05.04.2021

Akbalık, S., Oral, R.A., Dağdelen, A.F., Alkın, E., Uğur, N., Davarcı, B., Karataş, A.B., Sağlam, M. (2021). Havuç çipsinde ideal üretim parametrelerinin belirlenmesi. *GIDA* (2021) 46 (3)539-551 doi: 10.15237/gida. GD20140.

Akbalık, S., Oral, R.A., Dağdelen, A.F., Alkın, E., Uğur, N., Davarcı, B., Karataş, A.B., Sağlam, M. (2021). Determination of optimum production parameters in carrot chips. GIDA (2021) 46 (3)539-551 doi: 10.15237/gida. GD20140.

ÖZ

Bu çalışmanın amacı havucun, alternatif bir çerez gıda olarak kullanılabilme olanaklarının araştırılmasıdır. Bunun için havuçların 3 farklı kalınlıkta (1, 1.5 ve 2 mm) kesilip 100 °C'de 3 farklı sürede (4, 5 ve 6 dk) kurutulması sonrası kızgın yağda 3 farklı sıcaklık (170, 180 ve 190 °C) ve sürede (2, 2.5 ve 3 dk) kızartılması ile 81 farklı havuç çipsi üretilmiştir. Tüm numuneler duyu özellikleri (görünüş, çıtırlık, lezzet, genel) yönünden değerlendirilip en yüksek puanı alan 10 numunede bazı analizler (tekstür, renk, kuru madde, su aktivitesi ve yağ) yapılmıştır. Değerlendirme sonucunda; 1.5 mm kalınlıkta dilimlenip, 100°C'de 4 dk kurutma sonrası 180°C'de 2 dk kızartılmış H/1.5/4/180/2 kodlu numunenin en uygun değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu numunede ilave analizler (vitamin A ve C, beta-karoten, toplam şeker, diyet lif, protein, kül ve tuz) ile içeriği detaylı olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Havuç, havuç çipsi, kurutma, kızartma

DETERMINATION OF OPTIMUM PRODUCTION PARAMETERS IN CARROT CHIPS

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the possibilities of carrots to be used as an alternative snack food. Carrots were cut into a certain thicknesses (1/1.5/ 2 mm), dried at a specific condition (4/5/6 min. at 100°C) and fried in hot oil at a specific condition (2/2.5/3 min. at 170/180/190°C). Then, 81 different carrot chips were produced. All samples were evaluated in terms of their sensory properties (appearance, crunch, flavor, general) and some analysis (texture, color, dry matter, water

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*

✉: sabriakbalik47@gmail.com,

☎: (+90) 532 773 1599

☎: (+90) 224 246 4721

Sabri Akbalık; ORCID no: 0000-0001-5902-4320

Rasim Alper Oral; ORCID no: 0000-0001-7530-7478

Adnan Fatih Dağdelen; ORCID no: 0000-0002-6777-273X

Emine Alkın; ORCID no: 0000-0002-4451-325X

Nagihan Uğur; ORCID no: 0000-0003-2429-9898

Bayram Davarcı; ORCID no: 0000-0003-1608-0570

Ayşe Binnur Karataş; ORCID no: 0000-0001-7750-5427

Mehmet Sağlam; ORCID no: 0000-0003-3273-6103

activity and total oil) were made on the 10 samples with the highest score. As a result of the evaluation, it was determined that the sample coded H/1.5/4/180/2 (1.5 mm thickness/100°C 4min. drying/180°C 2min. frying) has the most appropriate values. The content of this sample was determined in detail by additional analysis (vitamin A, C, beta-carotene, total sugar, dietary fiber, protein, ash and salt).

Keywords: Carrot, carrot chips, drying, frying

GİRİŞ

İnsanlar var olduğu sürece yaşamak için beslenmek zorunluluğu nedeniyle çiğ olarak tüketemediği veya koruyamayacağı birçok gıdayı çeşitli şekil ve formlara dönüştürerek kullanabilmektedir (Ceylan vd., 2003). İnsanların, yoğun hayat temposu, yaşam tarzlarındaki değişimler nedeniyle, hızlı tüketim şartlarında hazır, paketlenmiş, taşınması kolay gıdaların yeri beslenmede önemli bir yer tutmaktadır. Bunun sonucunda teknolojik gelişmelerle birlikte çok çeşitli hazır gıdalar üretilmektedir (Uzun, 2002).

Çerez gıdalar; cips, patlamış mısır, ekstrüde ürün, kraker, bisküvi ve kahvaltılık tahıl ürünlerinin de dahil edildiği, ambalajlarından çıkarıldıktan sonra hemen tüketilen gıdalar olarak ifade edilmektedir (Özer, 2007). Çerez gıdalar, dünya nüfusunun büyük bölümünün severek tükettiği bir gıda türü olup, özellikle çocukların beslenme alışkanlıklarının bir kısmını oluşturmaktadır (Ibanoğlu vd., 2006; Meng vd., 2010; Thakur ve Saxena, 2000).

Yapılan alternatif çalışmalarda sebze ve meyveler kullanılarak cips elde edildiği görülmektedir. Türkiye’de patates ve mısır dışında alternatif bir ürünle cips üretme çalışmaları sınırlı olmakla beraber dünyada fazlaca çalışma bulunmakta ve üretim gerçekleştirilmektedir. Çerez gıdaların hafif, raf ömürleri uzun ve depolamaya elverişli olmaları önemli özelliklerindedir. Bu tür gıdaların taze gıdalara göre daha dayanıklı olması ve lezzet olarak da beğenilmesi tüketilmelerini artırmaktadır. Kendine özgü kalite kriterlerine sahip çerez gıdalarda, görünüş (optik, fiziksel, sunuş), tekstür ve lezzet (tat, koku) gibi duyu özellikler öncelikli olarak aranmaktadır (Mazumder vd., 2007).

Dünyada en çok tüketilen çerez gıdalar arasında özellikle patates ve mısır cipsleri yer almaktadır. Cipslerin en iyi tüketicisi çocuklar olsa da

günümüzde cipsler, başta gençler olmak üzere toplumdaki tüm insanların tüketmekten zevk aldığı gıdalardır (Shoar vd., 2010). Çerez gıdaların besleyici özellikleri bakımından çok iyi kaynaklar olmadığı bilinmesine rağmen bazı ülkelerde kişi başı cips tüketim miktarları incelendiğinde, bu rakamın ABD’de kişi başı ortalama 9 kg, İngiltere’de 5 kg, Ortadoğu ülkelerinde 3 kg, ülkemizde ise 950 g olduğu bildirilmektedir (Karaton, 2017).

Derin yağda kızartma uygulaması gıda endüstrisinde yaygın biçimde kullanılan bir yöntemdir. İşlem sürecinde suyun kaynama noktası üzerinde olan yağ banyosundaki gıdanın suyu buharlaştırılarak yüzeyi yağ ile kaplanır. Bu tip gıdalarda yapıdaki suyun yerine yağ yüklemesi en önemli parametredir. Ancak son zamanlarda tüketiciler daha sağlıklı ve düşük yağ içerikli gıdalara yönelmektedir. Özellikle yağlı ürünlerin koroner kalp hastalıkları, kanser, diyabet ve hipertansiyon gibi hastalıklara sebep olması tüketicinin tercih sebebinin etkilemektedir. Bununla birlikte sağlıklı ve düşük yağ içerikli gıda tercih eden tüketici aynı zamanda ürünün arzulan özelliklerinin de değişmemesini istemektedir. Bu kapsamda kurutma, fırınlama ve ekstrüzyon gibi uygulamalar kullanılarak yağ oranının azaltılmasına dönük çalışmalar yapılmış, ancak bunlardan hiçbiri kızartılmış gıdalardaki tekstür, görünüş ve tat gibi kalite kriterlerini karşılayamamıştır (Dueik vd., 2010).

Havuç (*Daucus carota* L.), dünya tarımında en yaygın üretilen kök sebzelerden olup 60 türünün içerisinde sadece birkaç çeşidi kültüre alınmıştır. Beyazdan sarıya, turuncu, açık mor, koyu kırmızı veya menekşeye kadar değişik renklerde olan havuç şemsiyegiller (Umbelliferae) familyasının bir üyesidir (Sharma ve ark., 2012; Bayrakçı, 2020). Anayurdunun Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika olan havucun günümüzde FAO verilerine göre Türkiye’nin de içinde bulunduğu 126 ülkede

tarımı yapılmaktadır. Dünya’da olduğu gibi Türkiye’de de fazla üretilen ve çoğunlukla taze tüketilen bu sebze, en fazla Asya kıtasında üretilmekte ve Türkiye, dünya üretiminin %1,3 ile sekizinci sırasında yer almaktadır. Türkiye de havuç üretiminin en yoğun olarak yapıldığı il Konya olup bunu Ankara, Hatay, Denizli, Karaman, Burdur, Antalya ve İzmir illeri izlemektedir (Anonymous, 2020a; 2020b).

Havuç, %89 su, %6.5 karbonhidrat, %0.89 protein, %0.76 kül (Fe, P, Ca, Mg, K, Na, Zn vd), %0.2 toplam yağ, %2.6 toplam diyet lif, % 0,014 vitaminler ve karotenoidler (C, B1, B2, B3, B6, A, K1, Beta-karoten ve Lutein) içeren bir sebzedir (Turkomp, 2020a). Hoş lezzeti ve yüksek vitamin, mineral ve lif içeriği özellikle de diyet karotenoidler açısından en zengin bir sebze olan havuç, taze, kurutulmuş, meyve suyu, şekerleme, konserve şeklinde tüketilmektedir (Sharma ve ark., 2012; Wang ve ark., 2021).

Bu çalışmada; havuç cips elde etme olanakları araştırılarak ülkemizdeki havuç üretiminin farklı bir alanda değerlendirilmesi ile kullanımını yaygınlaştırarak yeni bir ürün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geliştirilen ürünün tüketici tercihlerine uygun, tekstür ve lezzete sahip, ülkemiz ekonomisine katkı sağlayabilecek özelliklerde olması hedeflenmiştir. Böylece havuçtan cips elde edilerek farklı bir değerlendirme şekliyle gıda sanayinde yeni bir çerez gıdanın geliştirilmesi ve çeşitli kızartma parametrelerinin denenmesiyle havuç cipsi üretimi hedeflenmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak farklı sürelerin denendiği bir kurutma işlemi uygulanmıştır. Ön işlem ile, ürünlerin nem düzeylerinin olabildiğince azalması sağlanmıştır. Bu işlemi takiben, farklı sıcaklık ve sürelerde derin yağda kızartma işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen üründe kalite kriterleri incelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada, Nantes çeşidi turuncu havuç (*Daucus carota*) yaş meyve sebze halinden tek seferde temin edilerek kullanıma alınmaya kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir (Şekil 1a.). Kızartma yağı olarak piyasadan alınan rafine ayçiçek yağı

kullanılmıştır. Analize alınmaya kadar üretilen cipslerin paketlenmesinde gaz ve ışık bariyer özellikli, 100 g’lık kilitli çok katlı (Polietilen/Aluminyum/Polietilen –PE/Al/PE) doypack ambalaj kullanılmıştır.

Yöntem

Havuç cipslerinin üretimi ve paketlenmesi

Havuçların yüzeyindeki kirler suyla iyice yıkanıp uzaklaştırıldıktan sonra bıçak yardımı ile üzerindeki siyah noktalar, havucun alt ve üst tarafındaki belirli bir kısım alınarak dilimlenmeye hazır hale getirilmiştir. Dilimleme cihazı (Seles 250C, Türkiye) kullanılarak 3 farklı kalınlıkta (1, 1.5 ve 2 mm) dilimlenen havuçların, dijital kumpas (Mitutoyo 150X, Japonya) yardımı ile kalınlıkları 0.01 mm hassasiyet ile kontrol edilmiştir. Kızartma süresinin kısaltılması ve daha gevrek bir yapı kazanması adına havuç dilimleri kurutma fırınının (Binder ED53, Almanya) tepilerine tek sıra halinde dizilerek 100 °C’de 3 farklı sürede (4, 5 ve 6 dk) ön kurutma gerçekleştirmiştir. Ön kurutulmuş havuç dilimleri derin yağ banyosunda (Arçelik Ark 40 Fz, Türkiye) 3 farklı sıcaklıkta (170, 180 ve 190°C) ve 3 farklı sürede (2, 2.5 ve 3 dk) kızartıldıktan sonra 1 dk yağın süzülmesi için bekletilmiştir. Daha sonra ürünler kaba filtre kağıtları üzerinde oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır (Şekil 1b). Yağ banyosunun sıcaklığı dijital termometre (Testo 105, Almanya) ile ve yağın kullanıma elverişlilik durumu ise toplam polar madde ölçüm cihazı (Ebro Fom 320, Fransa) kullanılarak takip edilmiştir.

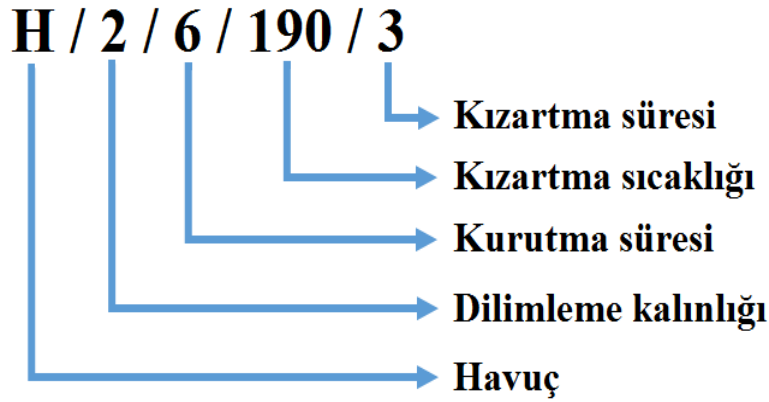
Havuç cips numuneleri ambalaj malzemelerine dolum yapıldıktan sonra azot gazı jenaratörü (Claind NiGen LCMS 40-1, İtalya) ile ambalaj içerisine %99,99 saflıktaki kuru azot gazı 1 dk süre ile uygulanarak ortamdaki oksijen ve nem uzaklaştırılıp analizlere alınmaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. 81 farklı uygulama ile üretilen numunelerin kodlanması Şekil 1c’de verilmiştir.



a. Taze havuç
Fresh carrot



b. Havuç çipsi
Carrot chips



c. Kodlanma açıklaması
Coding description

Şekil 1. Taze havuç (a) ve havuç çipsi (b) numune görselleri ile numune kodlama (c) açıklaması
Figure 1. Image of fresh carrot (a) and carrot chips sample (b) and description of sample coding (c)

Analizler

Duyusal analizler

Duyusal analizlerde deneyimli 7 kişilik panel grubuna kısa bir ön bilgilendirme yapıldıktan sonra beyaz plastik tabaklarda sunulan havuç çipsi numunelerinin görünüş, çıtırlık, lezzet ve genel değerlendirme bakımından 5 ölçekli hedonik skala ile değerlendirilmesi istenmiştir. Bu skalada 5 çok iyi ve 1 çok kötü olarak tanımlanmıştır (TS EN ISO 5492; Kramer ve Twigg, 1984).

Fizikokimyasal analizler

Numunelerde kuru madde miktarı AOAC 964.22 metoduna göre gravimetrik olarak, su aktivitesi

AOAC 978.18 metoduna göre su aktivite ölçüm cihazı (Decagon AquaLab3, ABD) ile, protein miktarı AOAC 990.03 metoduna göre protein tayin cihazı (Leco FP528, ABD) ile, yağ miktarı AOAC 920.39 metoduna göre yağ tayin cihazı (Ankom XT10, ABD) ile, kül miktarı AOAC 942.05 metoduna göre gravimetrik olarak, tuz miktarı AOAC 971.27 metodun göre titrimetrik olarak, diyet lif miktarı AOAC 991.43 metoduna göre diyet lif cihazı (Ankom TDF, ABD) ile, renk ölçümleri (L, a, b) spektrofotometre (Konica Minolta CM5, Japonya) ile, toplam şeker miktarı AOAC 968.28 metodu ile titrimetrik olarak ve çipsin sertlik değeri ise tekstür analiz cihazında

(Stable Micro Systems TA.XT plus, İngiltere) 5 mm çaplı P-5 küresel prob kullanılarak, 1 mm/s test hızında sonuçların yer çekimi ivmesi (9,80665 m/s²) ile çarpılarak hesaplanmıştır.

Enstrümental analizler

Beta-Karoten analizi

5 g homojen edilmiş numunelerin üzerine 50 mL ekstraksiyon çözeltisi metanol/tetrahidrofuran (1/1) ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra filtre kâğıdından süzülür. Daha sonra 0.45 µm gözenek çaplı PVDF filtreden geçirilen numunelerden 20 µL HPLC cihazına (Agilent 1260 infinity, ABD) enjekte edilir. Apolar kolonda (Purospher STAR RP-18 endcapped LiChroCART 250 x 4.6mm x 5µm), metanol/tetrahidrofuran (95/5) mobil fazda ve 0.8 mL/dk akış hızı koşullarında DAD dedektörde 450 nm'de kalibrasyon eğrisine karşı beta-karoten miktarı hesaplanmıştır (Türkomp, 2020b).

A vitamini analizi

Gıdalarda 12 µg Beta-Karotenin, 1 µg retinol eşdeğeri cinsinden A vitamini hesaplanmıştır (Türkomp, 2020b).

C vitamini analizi

C vitamini analiz sonucu L-askorbik asit ile L-D askorbik asit toplamı üzerinden verilmiştir. Buna göre, 10 g homojen edilmiş numunelerden 100 mL'lik balon joje içine alınır. Üzerine yaklaşık 70-80 mL %3'lük meta fosforik asit çözeltisi ilave edilir. Çalkalayıcıda 10 dakika süreyle karıştırılır. Ölçü çizgisine %3'lük meta fosforik asit çözeltisiyle tamamlanır. Adi filtre kâğıdından geçirildikten sonra 0.45 µm filtreden süzülerek 20 µL olarak HPLC'ye enjekte edilir. Buradan L-askorbik asit hesaplanır. L-D askorbik asit için ise adi filtre kâğıdından süzülükten sonra üzerlerine 1 mg DL-ditiotreitol ilave edilerek 90-120 dk +4°C de karanlık ortamda bekletilir. 0.45 µm PVDF filtreden süzülerek 20 µL olarak HPLC'ye enjekte edilir. HPLC cihazında (Agilent 1260 infinity, ABD) apolar kolonda (Hichrom C18, 250 x 4.6 mm x 5µm), saf suda hazırlanmış %0,15'lik potasyum dihidrojen fosfat (pH 2.4'e orto fosforik asitle ayarlanmış) mobil fazda ve 0.5 mL/dk akış hızı koşullarında DAD dedektörde

254 nm'de kalibrasyon eğrisine karşı L-askorbik asit ve L-D askorbik asit hesaplanmıştır (Türkomp, 2020c).

Şeker bileşenleri analizi (Glikoz, fruktoz, sakkaroz)

40 g örnek tartılır ve blendera konur. Son konsantrasyon % 80 olacak şekilde konsantre etanol ilave edilir. 2-3 dk yüksek devirde karıştırıldıktan sonra balon içine alınarak, bir kondansörle 2 saat süreyle reflüks edilir. Ekstrakt önce kaba filtre kâğıdından, sonra whatman No:54'ten süzülür. Çökelti ve balon % 80'lik etanol ile iyice yıkanır (200 mL). Ekstrakt ve yıkamaların hacmi 25 mL'den az olana kadar döner buharlaştırıcıda uçurulur. Etanol kokusu gidinceye kadar numune konsantre edilir. Su ile 25 mL'ye tamamlanır ve Whatman No:42'den süzülür. Renkli çözelti Sep-pak C18 kolondan geçirilir ve HPLC (Shimadzu Corp., Japonya) cihazına 10 µL enjekte edilir. Amin kolonda (Shodex Asahi-pak NH2P-50 4E, 250 x 4.6 mm x 5 µm), asetonitril/su (80/20) mobil fazında ve 2 mL/dk akış hızı koşullarında refraktif indeks (RI) dedektörde kalibrasyon eğrisine karşı glukoz, fruktoz ve sakkaroz hesaplanmıştır (Türkomp, 2020d).

İstatiksel değerlendirme

Üretim uygulamalarının cips üzerine etkileri belirlemek üzere Çizelge 1'de belirtilen analizlerin sonuçları R Studio istatistik programı ile varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuş ve elde edilen veriler bağımsız değişkenlerin önemliliğini belirlemek için Tukey çoklu karşılaştırma testine göre %95 güven aralığında değerlendirilmiştir.

SONUÇ ve TARTIŞMA

Taze havuca ait bulgular

Çizelge 2'de çalışmada kullanılan taze havuca ait analiz bulgularının Türkomp Ulusal Gıda Kompozisyonu Veritabanındaki referans veriler (Türkomp, 2020a) ile karşılaştırılması yer almaktadır. Referans veriler ile büyük oranda uyumlu olan bu bulgulardaki küçük farklılıkların ise yetiştirme koşulları, havuç çeşidi ve depolama koşullarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 1. Taze havuç ve cips numunelerinde yapılan analizler ve veri sayısı
 Table 1. Analysis and number of data on fresh carrot and chips samples

Analizler / Analysis	Metot / Method	Paralel x Tekerrür / Repetition
Duyusal / Sensory	EN ISO 5492	7 x 1
Kuru madde / Dry matter	Kramer ve Twigg (1984)	
Su aktivitesi / Water activity	AOAC 964.22	
Protein / Protein	AOAC 978.18	
Yağ / Lipid	AOAC 990.03	
Kül / Ash	AOAC 920.39	1 x 6
Tuz / Salt	AOAC 942.05	
Diyet lif / Fiber	AOAC 971.27	
Toplam şeker / Total sugar	AOAC 991.43	
Renk / Color	AOAC 968.28	
Sertlik / Hardness	Spektrofotometre / Spectrophotometer	1 x 36
A vitamini / Vitamin A	Tekstür cihazı / Texture analyzer	15 x 1
β-Karoten / β-Carotene	Türkomp (2020b)	
C vitamini / Vitamin C	Türkomp (2020c)	2 x 3
Sakkaroz / Sucrose		
Glukoz / Glucose	Türkomp (2020d)	
Fruktoz / Fructose		

Çizelge 2. Taze havuca ait analiz sonuçları ve referans veriler ile karşılaştırılması
 Table 2. Results of fresh carrot analysis and comparison with reference data

Bileşenler Nutrients	n	Numune* Sample	Taze havuç (100 g) / Fresh carrot	
			Referans veriler (TürKomp) Reference data	
			Min.	Maks.
Su (g) / Water	6	89.8±0.10	88.28	90.20
Kül (g) / Ash	6	0.73±0.02	0.60	0.87
Protein (g) / Protein	6	0.69±0.04	0.70	1.09
Yağ, toplam (g) / Lipid	6	0.20±0.03	0.11	0.31
Toplam şeker (g) / Total sugar	6	7.00±0.48	5.93	7.27
Lif, toplam diyet (g) / Fiber	6	3.30±0.14	2.19	3.04
Sakkaroz (g) / Sucrose	6	3.38±0.27	1.92	6.20
Glukoz (g) / Glucose	6	0.95±0.08	0.24	1.36
Fruktoz (g) / Fructose	6	2.00±0.17	0.25	1.27
Tuz (g) / Salt	6	0.13±0.00	0.08	0.19
C vitamini (mg) / Vitamin C	6	1.99±0.05	3.1	8.0
A vitamini (RE) / Vitamin A	6	365±21	386	829
β-Karoten (µg) / β-Carotene	6	4374±248	4627	9947
Renk – L / Color - L	18	50.1±3.4	-	-
Renk – a / Color – a	18	19.3±2.7	-	-
Renk – b / Color - b	18	31.8±3.7	-	-

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. / Values are given as mean ± SD.

Havuç cipsi bulguları

Havuç cipsi üretiminde 4 farklı parametrede (dilim kalınlığı, kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresi) 3'er farklı uygulama ile toplamda 81 farklı ürün üretilmiştir. Bu ürünler öncelikli olarak 7 kişiden oluşan panelist grup tarafından 4 farklı özellik (görünüş, çıtırlık, lezzet ve genel değerlendirme) yönünden duyuşal olarak değerlendirilmiştir. Birinci değerlendirme sonucunda en yüksek toplam ortalama puanı alan ilk 10 numune seçilerek geri kalan numuneler elenmiştir. İlk on numunenin, toplam 20 puan üzerinden aldıkları puanlar ve istatistiksel değerlendirmeleri Çizelge 3'de verilmiştir. Sonuçlara göre genel olarak en iyi veriler 1.5 mm dilim kalınlığına sahip ve 170 ile 180°C kızartma sıcaklıklarında elde edilmiştir. En yüksek puanları standart sapma değerleri de göz önüne alındığında H/1.5/6/170/2 (18.6±0.7) ile H/1.5/4/180/2 (17.0±2.8) kodlu numuneler almıştır.

Üretim uygulama parametrelerinden dilim kalınlığının (1, 1.5 ve 2 mm) görünüş, çıtırlık, lezzet, genel değerlendirme kriterleri ile toplam puan üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). 100°C'deki 3 farklı kurutma süresinin (4, 5, 6 dk) görünüş, çıtırlık, genel değerlendirme kriterleri ile toplam puan üzerine etkisi önemli bulunurken ($P < 0.05$), lezzet üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Kızartma sıcaklıklarının (170, 180, 190°C) görünüş, lezzet, genel değerlendirme kriterleri ile toplam puan üzerine etkisi önemli bulunurken ($P < 0.05$), çıtırlık üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). Kızartma süresinin (2, 2.5, 3 dk) görünüş, çıtırlık, genel değerlendirme kriterleri ile toplam puan üzerine etkisi önemli bulunurken ($P < 0.05$), lezzet üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$).

Çizelge 3. Duyusal özellikleri yönünden ilk on havuç cipsine ait sonuçlar

Table 3. Sensory property results of the top ten carrot chips

No	Numune kodu <i>Sample code</i>	Görünüş <i>Appearance</i>	Çıtırlık <i>Crunch</i>	Lezzet <i>Flavor</i>	Genel değerlendirme <i>General evaluation</i>	Toplam puan <i>Total score</i>
1	H/1.5/6/170/2	4.4±0.0 ^{cd}	5.0±0.0 ^d	4.6±0.0 ^b	4.6±0.0 ^e	18.6±0.7 ^e
2	H/1.5/4/180/2	5.0±0.0 ^d	4.1±1.4 ^{bcd}	3.9±1.4 ^{ab}	4.0±0.0 ^{cde}	17.0±2.8 ^{de}
3	H/1.5/6/170/2.5	4.4±0.7 ^{cd}	4.1±0.0 ^{bcd}	3.7±1.4 ^{ab}	4.1±0.7 ^{de}	16.3±1.4 ^{cde}
4	H/1.5/5/170/2.5	3.9±0.0 ^{bc}	4.1±0.0 ^{bcd}	3.9±1.4 ^{ab}	3.7±0.7 ^{bcd}	16.1±2.1 ^{bcd}
5	H/1.5/5/170/2	5.0±0.0 ^d	3.9±0.0 ^{abcd}	3.4±0.7 ^{ab}	2.7±0.7 ^{abc}	15.0±1.4 ^{abcd}
6	H/1.5/5/170/3	3.1±0.7 ^{ab}	3.6±1.4 ^{abc}	3.4±0.7 ^{ab}	3.9±0.0 ^{bcd}	14.0±1.4 ^{abc}
7	H/1.5/5/180/2	3.3±0.0 ^{ab}	4.3±0.0 ^{cd}	3.0±1.4 ^{ab}	2.9±0.7 ^{abcd}	13.4±0.7 ^{ab}
8	H/1.5/6/180/2	2.9±0.0 ^a	4.3±0.0 ^{cd}	3.1±1.4 ^{ab}	2.6±0.0 ^{ab}	12.9±1.4 ^{ab}
9	H/2/5/190/2	4.0±0.0 ^{bc}	3.0±0.0 ^{ab}	2.9±0.0 ^a	2.7±0.7 ^{abc}	12.6±0.7 ^a
10	H/1/5/170/2	4.6±0.7 ^{cd}	2.9±0.0 ^a	3.0±0.7 ^{ab}	1.9±0.7 ^a	12.3±2.1 ^a

* Değerler ortalama ± standart sapma (n=7) olarak verilmiştir. Farklı harfler aynı sütunda verilen ortalamalar arasında istatistiksel anlamda fark olduğunu ifade etmektedir ($P < 0.05$).

Values are given as mean ± SD (n=7). Different lower case letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Birinci değerlendirme sonucunda en yüksek puanı alan ilk on numuneye, cipsler için öncelikli ve önemli olan analizler (tekstür, renk, su aktivitesi, kuru madde, yağ) yapılmıştır. Buna göre tekstürel özellikleri yönünden havuç cipslerinin kırılmaya karşı gösterdiği direnç sonuçlarına göre H/1.5/4/180/2 kodlu cips numunesi en yüksek, H/1/5/170/2 kodlu cips numunesi ise en düşük puanı almıştır (Çizelge 4). Havuç dilim kalınlığı,

kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresinin tekstürel özellik (sertlik değeri) üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Fan vd. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, derin yağda kızartılan havuç cipsinde basınç ve sıcaklık değerleri artışında uygulanan kuvvet değerlerinin azaldığı bildirilmiştir. Yine Kita vd. (2007) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise,

sekiz farklı yağ çeşidinde ve 3 farklı sıcaklıkta (150, 170 ve 190°C) kızartılan patates cipslerinin yağ miktarları ve tekstürlerinin kızartma sıcaklığından ve yağ çeşidinden etkilendiği, ayrıca kızartma sıcaklığı arttıkça cipslerin yağ emilimlerinin ve sertliklerinin azaldığı belirtilmiştir. Moreira vd. (1995) tarafından tortilla cipslerinde kızartma süresinin tekstürel özelliklerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, sabit sıcaklıkta kırılabilirliğin belli süreye kadar arttığını daha uzun kızartma süresinde ise azaldığı bildirilmiştir. Pedreschi ve Moyano (2005)'e göre, 120°C'de kızartılan numunelerin yağ miktarı ve kırılmaya karşı gösterdiği direnç, 180°C'ye göre daha fazla olduğunu ve kızartma sıcaklığı arttıkça uygulanan kuvvetin azaldığı belirtilmiştir.

Çizelge 4. Duyusal özellikleri yönünden ilk on havuç cips numunelerine ait sertlik değerleri.
Table 4. Hardness results of the top ten carrot chips in terms of sensory properties

Numune Kodu Sample code	Sertlik (g) Hardness
H/1/5/170/2	129.9±16.8 ^a
H/1.5/5/180/2	168.3±3.0 ^{ab}
H/1.5/6/180/2	200.3±40.7 ^{bc}
H/1.5/6/170/2	210.1±46.4 ^{bcd}
H/1.5/6/170/2.5	210.4±24.0 ^{bcd}
H/2.0/5/190/2	220.9±18.6 ^{bede}
H/1.5/5/170/2.5	236.5±6.0 ^{cde}
H/1.5/5/170/2	268.7±0.6 ^{de}
H/1.5/5/170/3	274.6±39.0 ^e
H/1.5/4/180/2	278.1±11.3 ^e

Değerler ortalama ± standart sapma (n=15) olarak verilmiştir. Farklı harfler aynı sütunda verilen ortalamalar arasında istatistiksel anlamda fark olduğunu ifade etmektedir ($P < 0.05$).

Values are given as mean ± SD (n=15). Different lower case letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Taze havuçta renk değerleri; $L=50.08±3.4$, $a=19.25±2.7$ ve $b=31.81±3.7$ olarak ölçülmüştür (Çizelge 2). Cips üretimi ile birlikte renk değerlerinde meydana gelen değişim Çizelge 5'te verilmiştir. Buna göre parlaklık (L) değeri yönünden 45.3±2.1 ile en yüksek değer H/1.5/4/180/2 kodlu numunede ölçülürken, en düşük değer 31.5±5.5 ile H/1.5/5/170/3 kodlu

numunede tespit edilmiştir. Havuçların dilim kalınlığı, kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresinin L renk kriter değeri üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Cips numunelerinin kırmızılık(+)/yeşillik(-) değerleri (a) üzerinden incelendiğinde, en yüksek a değeri 20.3±1.5 ile H/1.5/6/170/2 kodlu numunede tespit edilirken, en düşük a değeri 14.2±1,5 ile H/1.5/5/170/3 kodlu numunesinde tespit edilmiştir. Havuçların dilim kalınlığı, kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresinin a renk kriter değeri üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0,05$). Cips numunelerinin sarılık(+)/mavilik(-) değerleri (b) üzerinden incelendiğinde, en yüksek b değeri 42.5±4.8 ile H/1.5/4/180/2 kodlu numunede tespit edilirken, en düşük b değeri 26.4±4.1 ile H/1.5/5/170/3 kodlu numunesinde tespit edilmiştir. Bu durum a verileri ile örtüşmektedir. Havuçların dilim kalınlığı, kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresinin b renk kriter değeri üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0,05$).

Cipsin rengi tüketici beğenisi için çok önemli bir kalite kriteri olup, enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonlarına, ısı transfer katsayısına, gıdanın bileşimi (şeker ve azot içeriği gibi), pH değeri, sıcaklık, süre, kızartmalık yağın türü gibi etkenlere bağlı olarak da değişebilmektedir (Pedreschi vd., 2007a; 2007b; Santis vd., 2007). Yapılan birçok çalışmada da kızartma sıcaklığının artmasıyla parlaklığın (L) azaldığı belirtilmiştir (Fan vd., 2005; Pedreschi vd., 2007a; Pedreschi ve Moyano, 2005; Dueik vd., 2010). Çalışmamızda ise dilim kalınlığı, kurutma süresi ve kızartma sıcaklığı gibi ilave parametrelerde göz önüne alındığında sıcaklık ve sürenin renk üzerine etkisinin önemli olması ile literatür verileri örtüşmektedir.

Çizelge 6'da görüldüğü gibi cips numunelerinin su aktivite (a_w) değerleri 0.349-0.387 arasında tespit edilmiştir. Oldukça yakın aralıkta dağılım gösteren su aktiviteleri yönünden en yüksek değeri 0.387±0.003 a_w ile H/1.5/6/180/2 kodlu numunede saptanırken, en düşük değeri ise 0.349±0.001 a_w ile H/1.5/5/180/2 kodlu numunede saptanmıştır. Cips numunelerindeki a_w değeri ile havuç dilim kalınlığı, ön işlem süresi, kızartma sıcaklığı ve süresi etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 5. Duyusal özellikleri yönünden ilk on havuç cips numunelerine ait renk analiz değerleri (L , a , b).
 Table 5. Color analysis (L , a , b) results of the top ten carrot chips in terms of sensory properties

Numune Kodu <i>Sample code</i>	Parlaklık (L) <i>Lightness</i>	Kırmızılık(+) / Yeşillik(-) (a) <i>Red(+)/ Green(-)</i>	Sarılık(+) / Mavilik(-) (b) <i>Yellow(+)/ Blue(-)</i>
H/1.5/5/170/3	31.8±5.5 ^a	14.2±1.5 ^a	26.4±4.1 ^a
H/1/5/170/2	36.7±3.7 ^b	16.1±0.1 ^{ab}	31.2±0.6 ^{ab}
H/1.5/5/170/2.5	37.2±3.0 ^b	16.5±2.6 ^b	32.3±5.9 ^{bc}
H/1.5/5/180/2	38.5±4.4 ^b	16.1±2.3 ^{ab}	35.5±2.8 ^{bcd}
H/1.5/6/180/2	38.8±12.2 ^b	17.1±3.9 ^b	36.7±11.8 ^{cde}
H/1.5/5/170/2	40.0±9.7 ^{bc}	18.0±5.5 ^b	38.4±8.2 ^{def}
H/1.5/6/170/2.5	40.1±6.5 ^{bc}	16.1±0.2 ^{ab}	36.0±8.7 ^{bcd}
H/2/5/190/2	40.3±6.0 ^{bc}	16.9±3.9 ^b	34.9±7.6 ^{bcd}
H/1.5/6/170/2	44.2±1.4 ^{cd}	20.3±1.5 ^c	39.9±7.3 ^{ef}
H/1.5/4/180/2	45.3±2.1 ^d	18.3±1.7 ^{bc}	42.5±4.8 ^f

* Değerler ortalama ± standart sapma (n=36) olarak verilmiştir. Farklı harfler aynı sütunda verilen ortalamalar arasında istatistiksel anlamda fark olduğunu ifade etmektedir ($P < 0.05$).

Values are given as mean ± SD (n=36). Different lower case letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Cips numunelerine ait kurumadde miktarları %97.09-98.45 arasında bulunmuştur (Çizelge 6). En yüksek kurumadde %98.45±0.03 ile H/1.5/5/170/3 kodlu numunede, en düşük kurumadde ise %97.09±0.02 ile H/1.5/5/170/2 kodlu cips numunesinde saptanmıştır. Havuç dilim kalınlığı, kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresinin cips numunelerinin kurumadde miktarı üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Havuç %90'a yakın oranda su içerdiğinden dolayı kurutma yapılmadan kaliteli cips elde edilememektedir. Bu amaçla üründeki suyun bir kısmını uzaklaştırmak için havuçlara kurutma işlemi uygulanarak, cips üretimi için havuç dilimleri ideal bir duruma getirilmiştir. Üretilen cips numunelerde ise ortalama kuru madde oranı %98 civarında olup, TSE'nin mısır ve patates cipsi ile ilgili standartlarında (TS 3628, TS 11998) yer alan limitlerine göre (kurumadde mısır cipslerinde en az %97, patates cipslerinde en az %96.5 olmalı) kıyaslandığında uygun olduğu görülmüştür. Kuru maddesi yüksek olan cipslerin daha az yağ emeceği ve tekstürel özelliklerinin daha iyi olacağı bildirilmiştir (Kita vd., 2007). Yapılan başka bir çalışmada da, derin yağda kızartılan havuç cipsinde belli bir sıcaklığa kadar nem içeriğinin azaldığı bildirilmiştir (Fan vd., 2005).

Çizelge 6'da görüldüğü gibi cips numunelerinin kurumadde üzerinden yağ miktarları %31.66 -

44.47 arasında bulunmuştur. En yüksek yağ miktarları H/1.5/5/180/2 kodlu numunede saptanırken en düşük yağ miktarı H/1.5/6/180/2 kodlu numunede saptanmıştır. Cips numunelerinde yağ miktarı üzerine havuçların dilim kalınlığı, kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresi etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Cipsler ile ilgili yapılan çalışmalarda kızartma sıcaklığı arttıkça yağ emiliminin azaldığı bildirilmiştir (Pedreschi ve Moyano, 2005; Fan vd., 2005). Kızartma işleminin ilk 10 sn'de maksimum yağ emme ve su buharlaşması gerçekleşirken, kızartma işleminin 30-40 sn'leri arasında yapıda büyük gözenekler oluşur. Yüksek sıcaklığın etkisi ile gıdanın yüzeyinde su buharlaşırken, uzaklaşan suyun yerine büyük gözeneklerden yağ emilir (Pedreschi vd., 2007b; Rajkumar vd., 2003).

Yağ içeriği ve özelliği tüketici yönünden önemli bir duyusal ölçü olarak değerlendirilmekte olup %25-40 arasında değişmektedir. Tüketiciler fazla yağ içeriğine sahip olan cipsleri, yüksek kalori içermesi nedeniyle tercih etmemektedir. Tüketicilerin genel anlamda kuru madde miktarı fazla, şeker ve yağ oranları az olan ürünleri tercih ettiği bildirilmiştir (Cankurtaran, 2008). Salvador vd. (2009)'e göre patates cipsinin nem ve yağ miktarı ile doku sertliği ve gevrekliği arasında bir bağlantı bulunmaktadır.

Çizelge 6. Duyusal özellikleri yönünden ilk on havuç çips numunelerine ait temel analiz (yağ, su aktivitesi ve kuru madde) sonuçları.

Table 6. Basic chips analysis results (lipid, water activity and dry matter) of the top ten carrot chips in terms of sensory properties.

Numune Kodu <i>Sample code</i>	Yağ (%) (KM de) <i>Lipid (DM)</i>	Su aktivitesi (a_w) <i>Water activity</i>	Kuru madde (%) <i>Dry matter</i>
H/1.5/6/180/2	31.66±0.40 ^a	0.349 ±0.001 ^a	97.56±0.21 ^{bc}
H/1/5/170/2	31.79±1.20 ^a	0.373±0.006 ^b	98.43±0.05 ^f
H/1.5/5/170/2	32.24±0.85 ^a	0.376±0.004 ^{bc}	97.09±0.02 ^a
H/1.5/6/170/2.5	34.08±1.13 ^{ab}	0.379±0.005 ^{bc}	97.80±0.08 ^{cde}
H/1.5/4/180/2	35.58±1.09 ^{bc}	0.375±0.003 ^{bc}	97.38±0.04 ^b
H/1.5/5/170/3	37.84±1.18 ^{cd}	0.350±0.006 ^a	98.45±0.03 ^f
H/2/5/190/2	38.62±0.85 ^d	0.357±0.008 ^a	97.69±0.06 ^{cd}
H/1.5/6/170/2	39.95±1.01 ^{de}	0.376±0.006 ^{bc}	97.79±0.12 ^{cde}
H/1.5/5/170/2.5	41.57±2.00 ^e	0.377±0.009 ^{bc}	98.03±0.05 ^e
H/1.5/5/180/2	44.47±1.04 ^f	0.387±0.003 ^c	97.90±0.17 ^{de}

* Değerler ortalama ± standart sapma (n=6) olarak verilmiştir. Farklı harfler aynı sütunda verilen ortalamalar arasında istatistiksel anlamda fark olduğunu ifade etmektedir ($P < 0.05$).

Values are given as mean ± SD (n=6). Different lower case letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$).

Havuç çipsi ile ilgili bir standart bulunmadığından, çalışma bulgularındaki yağ içerikleri TSE'nin mısır ve patates çipsleri ile ilgili standartlarında (TS 3628, TS 11998) yer alan yağ içeriği değeri (en fazla %40 olmalı) ile kıyaslanabilmektedir. Buna göre duyusal değerlendirmede en yüksek puanı alan on çips numunesi içerisinde sadece iki numune (H/1.5/5/170/2.5 ve H/1.5/5/180/2) standart limitin dışına çıkmıştır. Duyusal değerlendirmede en yüksek puanı alan ilk iki numuneden ise H/1.5/4/180/2 kodlu numunenin %35.58 yağ oranı ile daha düşük yağ içeriğine sahip olduğu görülmüştür.

81 çeşit çips numunesinde duyusal analiz ile yapılan eleme sonucunda, en yüksek puana sahip ilk on numunede 5 temel çips analizi (tekstür, renk, yağ, su aktivitesi ve kurumadde) yönünden incelenmiştir. Sonuçta tekstür, renk, yağ ve su aktivitesi analizleri yönünden en iyi değerlere sahip olan, çips standartlarına göre uyumluluk gösteren ve duyusal analizde de en yüksek ikinci puana sahip H/1.5/4/180/2 kodlu numune ön plana çıkarak en uygun numune olarak seçilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. En uygun değerlere sahip havuç çipsi numune görseli (H/1.5/4/180/2).

Figure 2. Image of carrot chips sample with optimal values (H/1.5/4/180/2).

En uygun temel kalite özelliklerine sahip olan H/1.5/4/180/2 kodlu çips numunesinin detaylı bileşimini belirlemek için yapılan analizler (Vitamin A ve C, Beta-Karoten, Toplam şeker, Diyet Lif, Protein, Kül, Tuz) sonucunda elde edilen bulgular Çizelge 7'de verilmiştir.

Çizelge 7. Duyusal ve temel cips analizleri yönünden en uygun değerlere sahip havuç cipsi numunesine (H/1.5/4/180/2) ait kapsamlı analiz sonuçları.

Table 7. Comprehensive analysis results of the best carrot chips (H/1.5/4/180/2) in terms of sensory and basic analysis results.

Analizler <i>Analysis</i>	n	Sonuç* <i>Results</i>	Analizler <i>Analysis</i>	n	Sonuç* <i>Results</i>
Kuru madde (%) <i>Dry matter</i>	6	97.38±0.04	β-Karoten (mg/kg) <i>β-Carotene</i>	6	7.5±0.6
Protein (%) <i>Protein</i>	6	3.38±0.15	Vitamin A (mg/kg) <i>Vitamin A</i>	6	0.62±0.05
Toplam yağ (%) <i>Lipid</i>	6	35.6±1.1	Vitamin C (mg/kg) <i>Vitamin C</i>	6	TE*
Toplam Şeker (%) <i>Total sugar</i>	6	33.96±0.19	Renk L <i>Color - L</i>	36	45.3± 2.1
Diyet lif (%) <i>Fiber</i>	6	10.9±0.4	Renk a <i>Color - a</i>	36	18.4±1.7
Kül (%) <i>Ash</i>	6	3.47±0.05	Renk b <i>Color - b</i>	36	42.5±4.8
Tuz (%) <i>Salt</i>	6	0.09±0.08	Sertlik (g) <i>Hardness</i>	15	278.1±11.4
Su aktivitesi (a _w) <i>Water activity</i>	6	0.38±0.00			

*TE: Tespit Edilmedi / *Not detected*

* Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. / *Values are given as mean ± SD.*

Sonuç olarak; Yararlı birçok bileşeni içeren ve ülkemizde çok miktarda üretilen bir sebze olan havucun potansiyel kullanım seçeneklerinin artırılmasını sağlayan ve günümüz tüketim alışkanlıklarını göz önüne alan yeni bir çerez gıdanın geliştirilmesi amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Dört farklı parametrede (dilim kalınlığı, kurutma süresi, kızartma sıcaklığı ve kızartma süresi) üçer farklı uygulama ile toplamda 81 farklı havuç cipsi numunesinde, duyuşal ve temel cips analizleri ile iki aşamalı eleme sonucunda H/1.5/4/180/2 kodlu cips numunesi en uygun seçenek olarak (standartlara göre) belirlenmiştir. Bu numuneninde detaylı bileşim analizleri yapılarak etiket bilgileri için gerekli bilgiler toplanmıştır.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda farklı ön işlemler (haşlama, kaplama, ultrasonik), kurutma (infrared, mikrodalga) ve kızartma (vakum) yöntemleri kullanılması ile sebzelerin duyuşal özellikleri ve besin bileşimi üzerine etkileri iyileştirilebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı TAGEM/GYKMAE/A/17/A3/P06/02 proje numarası ile maddi olarak destekleyen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yer alan yazarların ve kurumların arasında herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan ederiz.

YAZARLARIN KATKISI

Sabri AKBALIK, Rasim Alper ORAL ve Adnan Fatih DAĞDELEN araştırmanın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesini sağlamıştır. Sabri AKBALIK, Adnan Fatih DAĞDELEN ve Emine ALKIN havuç cipslerinin hazırlanması ve duyuşal analizlerin yapılmasını sağlamıştır. Sabri AKBALIK, Nağihan UĞUR, Bayram DAVARCI, Ayşe Binnur KARATAŞ ve Mehmet SAĞLAM fizikokimyasal, enstrümental ve duyuşal analizlerin yapılmasını sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamışlardır.

KAYNAKLAR

- Anonymous (2020a). Food And Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.gov>. (Erişim tarihi: 10.11.2020).
- Anonymous (2020b). Türkiye İstatistik Kurumu Verileri. <http://www.tuik.gov.tr>. (Erişim tarihi: 10.11.2020).
- AOAC (1943). 942.05: Ash of animal feed, Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- AOAC (1965). 964.22: Solids (total) in canned vegetables. Gravimetric method, Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- AOAC (1976). 971.27: Sodium chloride in canned vegetables. Method III (potentiometric method), Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- AOAC (1978). 978.18: Water activity of canned vegetables, Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- AOAC (2000). 991.43: Total, Soluble and Insoluble dietary fiber in foods. Enzymatic-gravimetric method, MES-TRIS buffer, Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- AOAC (2000). 968.28: Total sugars in molasses as invert sugar. Lane-cynon constant volume volumetric method, Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- AOAC (2002). 990.03: Protein (Crude) in animal feed. Combustion method, Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- AOAC (2005). 920.39: Fat (crude) or ether extract in animal feed, Official Methods of Analysis AOAC International, Washington DC, the USA.
- Bayrakçı, H.A. (2020). Besleyici Değeri Yüksek Glutensiz Makarna Üretiminde Havuç Ve Nohut Ununun Kullanım İmkanlarının Araştırılması. Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Konya, Türkiye, 137 s.
- Cankurtaran, M. (2008). Kızartılmış Buğday Cipsi Üretimi ve Elde Edilen Buğday Cipslerinin Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Türkiye, 61 s.
- Ceylan, Y., Coşkun, Y., Karababa, E. (2003). Patates Cipsi Üretiminde Oluşan Yapısal Değişimler. *Standart Ekonomik Ve Teknik Dergi*, 42 (496).
- Dueik, V., Robert, P., Bouchon, P. (2010). Vacuum frying reduces oil uptake and improves the quality parameters of carrot crisps. *Food Chem*, 119 (3): 1143-1149.
- Fan, L., Zhang, M., Mujumdar, A. S. (2005) Vacuum Frying of Carrot Chips. *Drying Technology*, 23:645-656
- Ibanoğlu, Ş., Ainsworth, P., Özer, E. A., Plunkett, A. (2006). Physical and sensory evaluation of a nutritionally balanced gluten-free extruded snack. *J Food Eng*, 75 (4): 469-472.
- Karaton, N. (2017). *Luciobarbus esocinus* (Heckel 1843)'den Elde Edilen Balık Cipslerinin Besin Kompozisyonu ve Duyusal Özelliklerinin Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 13 (2): 153-162.
- Kita, A., Lisinska, G., Golubowska, G. (2007). The Effect of Oils and Frying Temperatures on the Texture and Fat Content of Potato Crisps. *Food Chem*, 102: 1-5.
- Kramer, A., Twigg, B. A. (1984). Quality Control for the Food Industry, Vol.1, The Avi Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut, 120-154.
- Mazumder, P., Roopa, B. S., Bhattacharya, S. (2007). Textural attributes of a model snack food at different moisture contents. *J Food Eng*, 79 (2): 511-516.
- Meng, X., Threinen, D., Hansen, M., Driedger, D. (2010). Effects of extrusion conditions on system parameters and physical properties of a chickpea flourbased snack. *Food Res Int*, 43(2): 650-658.
- Moreira, R. G., Palau, J., Sun, X. (1995). Deep - Fat Frying of Tortilla Chips: An Engineering Approach. *Food Technology*, 49 (4): 146-150.

- Özer, E. A. (2007). Ekstrüzyon yöntemi ile besleyici değeri yüksek çerez tipi fonksiyonel bir ürün geliştirme. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği AnaBilim Dalı Doktora Tezi, Adana, Türkiye, 222 s.
- Pedreschi, F., Moyano, P., (2005). Oil Uptake and Texture Development in Fried Potato Slices. *J Food Eng*, 70 (4): 557-563.
- Pedreschi, F., Leo'n, J., Mery, D., Moyano, P., Pedreschi, R., Kaack, K., Granby. K. (2007a). Color Development and acrylamide Content of pre-dried Potato Chips. *J Food Eng*, 79: 786-793.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Santis, N., Redresch, R. (2007b). Physical properties of pretreated potato chips. *J Food Eng*, 79:1474-1482.
- Rajkumar, V., Moreira, R., Barrufet, M. (2003) Modeling the structural changes of tortillachips during frying. *J Food Eng*, 60: 167-175
- Salvador, A., Varela, P., Sanz, T., Fiszman, S. M. (2009). Understanding potato chips crispy texture by simultaneous fracture and acoustic measurements. and sensory analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 763-767.
- Santis, N., Mendoza, F., Moyano, P., Pedreschi, F., Deymek, P. (2007). Soaking in a NaCl solution produce paler potato chips. *LWT - Food Science and Technology*, 40: 307-312.
- Sharma, K.D., Karki, S., Thakur, N.S. and Attri, S. 2012. Chemical composition, functional properties and processing of carrota review. *J Food Sci Technol*, 49: 22-32.
- Shoar, Z. D., Hardacre, A. K., Brennan, C. S. (2010). The physico-chemical characteristics of extruded snacks enriched with tomato lycopene. *Food Chem*, 123 (4): 1117-1122.
- Thakur, S., Saxena, D. C. (2000). Formulation of extruded snack food (gum based cereal pulse blend): optimization of ingredients levels using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 33 (5): 354-361.
- TSE (1991). TS 3628: Patates Cipsi Standardı, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TSE (1996). TS 11998: Şekillendirilmiş Cipsler-Mısır Cipsi, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TSE (2001). TS EN ISO 5492: Duyusal analizler - Terimler ve tarifleri, Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.
- TURKOMP (2020a). Turuncu havuç bileşenleri, Ulusal Gıda Kompozisyonları Veri Tabanı (TURKOMP). <http://www.turkomp.gov.tr/food-havuc-turuncu-258> (Erişim Tarihi: 10.07.2020).
- TURKOMP (2020b). Karotenoidlerin (lutein, likopen, beta-karoten) tayini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi (SOP 013.01), Ulusal Gıda Kompozisyonları Veri Tabanı (TURKOMP). <http://www.turkomp.gov.tr/about> (Erişim Tarihi: 10.07.2020).
- TURKOMP (2020c). C vitamini tayini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi (SOP 017.01), Ulusal Gıda Kompozisyonları Veri Tabanı (TURKOMP). <http://www.turkomp.gov.tr/about> (Erişim Tarihi: 10.07.2020).
- TURKOMP (2020d). Monosakkaritler (fruktoz, glukoz) ve disakkaritlerin (sakaroz, maltoz, laktoz) tayini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi (SOP 027.01), Ulusal Gıda Kompozisyonları Veri Tabanı (TURKOMP). <http://www.turkomp.gov.tr/about> (Erişim Tarihi: 10.07.2020).
- Uzun, Ö. (2002). Türkiye'de Değişik Firmalar Tarafından Üretilen Bazı Patates ve Mısır Cipslerinin Kimyasal, Fiziksel ve Duyusal Özellikler Yönünden Karşılaştırılması ve Standartlara Uygunluğunun İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Adana, Türkiye, 73 s.
- Wang, H., Fang, X.-M., Sutar, P.P., Meng, J.-S., Wang, J., Yu, X.-L., Xiao, H.-W. (2021). Effects of vacuum-steam pulsed blanching on drying kinetics, colour, phytochemical contents, antioxidant capacity of carrot and the mechanism of carrot quality changes revealed by texture, microstructure and ultrastructure. *Food Chem*, 338: 127799.



DETERMINATION OF THE FACTORS THAT CAUSE BITTERNESS DURING SHELF-LIFE IN WHITE CHEESE PRODUCED USING ULTRAFILTRATED MILK

Zerrin Arısoy, Zübeyde Öner*

Süleyman Demirel University, Engineering Faculty, Department of Food Engineering, Isparta, Turkey

Received/Geliş: 25.02.2021; Accepted/Kabul: 25.03.2021; Published online/Online baskı: 05.04.2021

Arısoy, Z., Öner, Z. (2021). Determination of the factors that cause bitterness during shelf-life in white cheese produced using ultrafiltrated milk. *GIDA* (2021) 46 (3) 552-565 doi: 10.15237/gida.GD21045.

Arısoy, Z., Öner, Z. (2021). UF Beyaz peynirde raf ömrü boyunca acılaşılmaya neden olan faktörlerin belirlenmesi. *GIDA* (2021) 46 (3) 552-565 doi: 10.15237/gida.GD21045.

ABSTRACT

This study aimed to determine the causes of bitterness problems in white cheese produced by ultrafiltration (UF). To investigate the association between the bitterness with the enzyme use or by the starter culture, white cheese was produced using UF-pasteurized and UF-raw milk with two different coagulating enzymes and two starter cultures with different proteolytic activities. Sensory analysis, protein, water-soluble nitrogen, 12% trichloroacetic acid-soluble nitrogen, 5% phosphotungstic acid-soluble nitrogen and acid degree values were determined on day 1, 30, 60 and 90 of the ripening periods. During the ripening process, bitterness was determined in the cheese samples due to proteolysis. The A cheese sample, which was produced using chymosin enzyme and a starter culture with high proteolytic activity, was determined to be the sample with the highest bitterness level in the sensory analyses, SDS-PAGE electrophoresis and HPLC analysis. 72.26% α s-casein hydrolysis was determined in the A cheese sample. According to HPLC results, a high hydrophobic peptide formation was determined with the increase in the area of hydrophobic peptides with a rate of 106% between 40 and 60 minutes.

Keywords: Cheese, proteolysis, ultrafiltration, bitterness

UF BEYAZ PEYNİRDE RAF ÖMRÜ BOYUNCA ACILAŞMAYA NEDEN OLAN FAKTÖRLERİN BELİRLENMESİ

ÖZ

Bu çalışmada, ultrafiltrasyon (UF) işlemi ile işlenen süt kullanılarak üretilen beyaz peynirdeki acılık sorunlarının nedenlerini belirlemek amaçlanmıştır. Acılık ile enzim kullanımı veya başlangıç kültürü arasındaki ilişkiyi araştırmak için, iki farklı pıhtılaştırma enzimi ve farklı proteolitik aktivitelere sahip iki başlangıç kültürüyle UF-pastörize ve UF-çiğ süt kullanılarak beyaz peynir üretilmiştir. Olgunlaşma periyodunun 1., 30, 60, ve 90. günlerinde protein, suda çözünen azot, %12 triklorasetik asitte çözünen azot, % 5 fosfotungstik asitte çözünen azot, asit değeri ve duyuşsal özellikler belirlenmiştir. Olgunlaşma sürecinde peynir örneklerinde proteoliz nedeniyle acılık meydana gelmiştir. Kimozin enzimi ve proteolitik aktivitesi yüksek bir starter kültür kullanılarak üretilen A peynir numunesinin duyuşsal analizler, SDS-PAGE elektroforezi ve HPLC analizlerinde en yüksek acılık seviyesine sahip

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉: zubeydeoner@sdu.edu.tr

☎: (+90) 246 211 15 96

Zübeyde Öner; ORCHID ID: 0000-0003-2557-0731

Zerrin Arısoy; ORCHID ID:0000-0002-8413-7607

numune olduğu belirlenmiştir. A peynir örneğinde alfa kazein %72.26 oranında hidrolize olmuştur. HPLC sonuçlarına göre hidrofobik peptit alanında (40-60 dak arasında) % 106 oranında artış belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: peynir, proteoliz, ultrafiltrasyon, acılaştırma

INTRODUCTION

White cheese is the most popular cheese in Turkey in terms of both production and consumption (Üçüncü, 2008). With the developing technology, modern methods such as membrane technology, in addition to classical methods, have been used in cheese production (Soltani, 2013). In dairy industry, traditional White cheese production lines have been replaced by a more modern ultrafiltration (UF) system. Proteolysis, one of the main biochemical reactions during ripening of cheese, plays a vital role in flavor development of most cheese types (Sousa et al., 2001). During cheese production, the primary proteolysis of casein is mostly carried out by rennet added to milk, while secondary proteolysis is carried out by hydrolysis of casein derivatives to small peptides and amino acids by starter cultures (Hayaloğlu and Özer, 2011). In proteolysis, casein is first broken down to peptides with large molecular weights by coagulating enzymes, then into small-molecular-weight peptides by the enzymes produced by starter cultures and then into free amino acids by peptidases (Üçüncü, 2008). It has been stated that lactic acid bacteria are responsible for the hydrolysis of casein-derived peptides (Hayaloğlu et al., 2004). Cell membrane-bound proteinases of *Lactococcus* spp. are involved in the process by the hydrolysis of large peptides produced from α_{s1} -casein or from β -casein by plasmin. Intracellular peptidases released from degraded cells are responsible for the breakdown of small peptides and the formation of free amino acids (Cinbaş, 2004). Bitterness taste in cheese associated with enzymes from starter microorganisms as well as from naturally present microorganisms could be caused by peptides formed as a result of the hydrolysis of α_{s1} and β -casein. Accordingly, the proteolytic enzyme concentration and proteolytic properties of the starter culture must be known. Therefore, the selection of product-specific starter culture, production method, and ripening conditions are of great importance (Kılıç and Eren-Vapur, 2003).

The bitter taste is a characteristic found in many foods and produced by different inorganic and organic substances. The taste of inorganic salts can be bitter as well as some amino acids (Üçüncü, 2008). Bitter peptides containing hydrophobic amino acids released by rennet and starter cultures in the clot are the main factors of bitter taste seen in many types of cheeses (especially cheeses produced using mesophilic cultures) and these peptides are formed by the effect of proteolytic enzymes on casein. Accordingly, the factors that cause bitterness include raw milk quality, psychrotrophic bacteria in the environment, milk composition, cooking temperature of curd, salt concentration, the amount of released whey, pH of the cheese, hygienic conditions, type of starter culture and the amount of rennet enzyme used. Among these factors, the types and amounts of rennet and starter culture are the most important factors for bitterness in cheese (Yıldırım et al., 2011).

Soltani et al. (2016) investigated the effect of camel chymosin and microbial enzyme (*Rhizomucor miebei*) on the microstructure and rheological properties of Iran UF White cheese during the 90-day ripening period. The researchers found that the degradation of α_{s1} -casein was affected by the coagulants used however β -casein degradation was not affected by these factors.

This study aimed to determine the levels of proteolysis, electrophoretic (SDS-PAGE) properties and peptide distribution in white cheese. The effects of starter culture, different milk coagulants and ripening time on these properties were also investigated. The causes of the sensory defect bitterness were thus investigated in the study.

MATERIAL AND METHODS

Cheeses were produced from raw cow's milk in the ultrafiltered White cheese line in Isparta

Cebeci Milk and Dairy Products factory in Turkey. The differences in UF White cheese production are given in Table 1. Raw cow's milk was transferred to the UF unit following the necessary chemical analysis. The obtained retentate was pasteurized at 80-82 °C for 15 seconds, homogenized and cooled, and then cooled to the 30-32 °C fermentation temperature and transferred to the filling unit. The coagulating enzyme (400 mL/1000kg retentate Chymax Plus and 100 mL/1000kg retentate Maryzm 55) and the starter culture (50 DCU/1000kg retentates) were added to the retentate in the mixing tank. In the filling unit, the milk in the mixing tank was filled into the packages. Following the curd formation, a dry salting procedure was carried out. Cheese manufacturing was performed in duplicate and all the analyses were carried out with two parallels.

Cheese working model is given below.

A cheese sample: White (Beyaz) cheese produced from ultrafilter pasteurized milk using starter

culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme

B cheese sample: White (Beyaz) cheese produced from ultrafilter pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme

C cheese sample: White (Beyaz) cheese produced from ultrafilter pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme

D cheese sample: White (Beyaz) cheese produced from ultrafilter pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme

E cheese sample: White (Beyaz) cheese production from raw milk by ultrafiltration with chymosin enzyme

F cheese sample: White (Beyaz) cheese production from ultrafilter raw milk by microbial enzyme.

Table 1. The experimental design in UF White cheese production

	A	B	C	D	E	F
	Pasteurized milk				Raw milk	
Starter culture	I	I	II	II	-	-
Milk coagulants	a	b	a	b	a	b

A cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme,

B cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme,

C cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme,

D cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme,

E cheese sample: Raw milk by chymosin enzyme,

F cheese sample: Raw milk by microbial enzyme.

I: starter culture with high proteolytic activity,

II: starter culture with low proteolytic activity

^a:100% Bovine chymosin,

^b: Microbial coagulant (from *Mucor miehei*)

Protein analysis

Cheese protein content was determined by the macro-Kjeldahl method (AOAC., 1990), water-soluble nitrogen (WSN) according to Kuchroo and Fox (1982), the 12% trichloroacetic acid-soluble nitrogen (TCA-SN) fractions according to Polychroniadou et al. (1999), the 5% phosphotungstic acid-soluble nitrogen (PTA-SN) fractions were determined according to the Jarrett et al. (1982) by micro-Kjeldahl method (IDF, 1993) The acid degree values (ADV) were

measured according to the procedure by Renner (1986) .

SDS polyacrylamide gel electrophoresis analysis

To determine the protein profile of UF White cheese samples, 30% acrylamide solution, 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 10% ammonium persulfate (APS), 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) and 1.0 M Tris-HCl (pH 6.8) were used (Laemmli, 1970). After preparing the gels, a 15 µL sample and 10 µL of the marker were loaded. The prepared

electrophoresis apparatus was run in a system under 80-100 V constant current approximately for three hours. SDS-Page electropherograms of cheese samples were evaluated using the Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System.

Proteolysis in cheese samples by HPLC

UF White cheese samples were lyophilized using the VirTis benchtop SLC device. Accordingly, 2.5 g lyophilized cheese sample was weighed, dissolved in 5 mL 0.1% trifluoroacetic acid (0.1% TFA deionized water) and then centrifuged at 14000 rpm for 30 minutes at 4°C. Centrifuged cheese samples were passed through a 0.45- μ m filter and 750 μ L sample was injected into the HPLC column (Donkor et al., 2007). Reverse Phase High-performance Liquid chromatography (HPLC, Shimadzu LC-20 AT Kyoto-JAPAN) and Zorbax 300 SB-C monometric column were used for the analysis of peptides in cheeses.

Sensory evaluation of cheese

After 1, 30 and 90 days of ripening the UF white cheeses were sensory evaluated. Cheese samples were appraised for taste and flavour (0-40 scale), body and texture (0-40 scale) and appearance (0-20 scale) by a trained panel of six judges familiar with UF white cheese (Peppas et al.1996).

Statistical analysis

Statistical analysis of the average values obtained chemical evaluation of cheese samples were analyzed by the SPSS 23.0 (SPSS Inc.IBM Corp., Chicago, IL) using the ANOVA procedure for analysis of variance. The results were expressed as mean standard error and the difference between means were tested for significance using Duncan's multiple range at ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the protein analysis

Protein values of the UF White cheese samples decreased during the ripening period and this decrease was statistically significant ($p < 0.05$) (Table 2). At the end of the ripening period (day 90), the highest protein content was found in the B cheese sample whereas the lowest protein content was found in the A cheese sample. It has been reported that the effect of using different starter culture, coagulating enzyme and storage temperature interactions on the protein value in UF White cheese samples during the ripening period was statistically significant ($p < 0.05$) (Arsoy and Öner, 2019).

Table 2. Protein contents of the UF White cheese samples during the ripening period
Protein value during cheese ripening

Cheese samples	Protein value during cheese ripening		
	day 1 %	day 30 %	day 90 %
A	14.17 \pm 0.15Aa	13.38 \pm 0.28Ba	11.21 \pm 0.07Da
B	14.24 \pm 0.01Aa	14.29 \pm 0.04Aa	13.5 \pm 0.03Ca
C	14.08 \pm 0.01Ba	14.15 \pm 0.05Aa	12.77 \pm 0.05Da
D	14.09 \pm 0.04Aa	13.71 \pm 0.16Ba	13.01 \pm 0.16Ca
E	14.13 \pm 0.17Aa	14.13 \pm 0.03Aa	12.93 \pm 0.06Ca
F	14.17 \pm 0.02Aa	14.05 \pm 0.01Ba	13.4 \pm 0.21Da

a–b Mean values with different lowercase superscripts indicate statistical differences between rows ($P < 0.05$).

A-D Mean values with different uppercase superscripts indicate statistical differences between columns ($P < 0.05$).

A cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme, B cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme, C cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme, D cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme, E cheese sample: Raw milk by chymosin enzyme, F cheese sample: Raw milk by microbial enzyme.

Al-Otaibi and Willbey (2005) determined that, in UF White cheese production, the use of chymosin in the production of cheese lowered the protein values. In the present study, a decrease in protein

value was observed in all cheese samples during the ripening process and these results were similar to those reported in the previous studies.

An increase was observed at WSN in all cheese samples during the ripening process (Table 3). In the cheese samples produced with UF-pasteurized milk (A-D cheese samples), water-soluble nitrogen values were determined in the range of 0.154-0.241 on the 30th day of the ripening and in the range of 0.249-0.543 on the 90th day of the ripening. Among the cheese samples produced using chymosin, water-soluble nitrogen value was found to be in the range of 0.154-0.543 in the A cheese sample produced with the starter culture with high proteolytic activity while this value was in the range of 0.154-0.249 in the C cheese sample produced using the starter culture with low proteolytic activity. The initial WSN values were the same whereas a higher increase was observed in the A cheese sample due

to the use of *Lb. helveticus*. In the cheese samples produced with the microbial enzyme, the WSN values in the B cheese sample produced using the starter culture with high proteolytic activity were in the range of 0.241-0.476 while these values were in the range of 0.188-0.510 in the D cheese sample produced using the starter culture with low proteolytic activity (Table 3). Although the initial WSN value of the D cheese sample produced using the starter culture with low proteolytic activity was lower than that of the B sample, it showed a higher increase on day 90 of the ripening period. The ripening index value in soluble protein ranged from 6.94 to 30.94 %. The highest increase was observed in the A cheese sample in which bitterness was the highest.

Table 3. WSN, TCA-SN, PTA-SN and the Ripening index values of the UF White cheese samples

	Ripening Time (day)	A	B	C	D	E	F
WSN	30	0.154	0.241	0.154	0.188	0.272	0.361
	90	0.543	0.476	0.249	0.510	0.403	0.524
Ripening index to WSN	30	7.34	10.76	6.94	8.74	12.27	16.41
	90	30.94	22.50	12.46	25.02	19.90	24.94
TCA-SN	30	0.128	0.120	0.126	0.119	0.112	0.098
	90	0.140	0.142	0.154	0.137	0.106	0.123
Ripening index in TCA-SN	30	6.10	5.38	5.68	5.54	5.06	4.45
	90	7.97	6.71	7.69	6.72	5.23	5.86
PTA-SN	30	0.0274	0.0216	0.0160	0.0133	0.0319	0.0355
	90	0.0464	0.0400	0.0334	0.0266	0.0402	0.0600
Ripening index in PTA-SN	30	1.31	0.96	0.72	0.62	1.44	1.61
	90	2.64	1.89	1.67	1.30	1.98	2.06

WSN: water-soluble nitrogen; TCA-SN: 12% trichloroacetic acid-soluble nitrogen; PTA-SN: 5% phosphotungstic acid-soluble nitrogen

A cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme, B cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme, C cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme, D cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme, E cheese sample: Raw milk by chymosin enzyme, F cheese sample: Raw milk by microbial enzyme.

Soltani (2013), in their study on the effect of different salt ratio and storage time on the properties of UF white cheese produced in Iran, has reported that WSN values were in the range of 0.368-0.743 and increased during the storage process. In numerous studies, it has been reported that WSN values increased during the ripening

process in White cheese produced by the UF method and the traditional method Güven and Karaca (2001), Topcu (2004), Karami et al., (2009), Öner (2015), Sarafi et al., (2020).

As seen in Table 3, TCA value increased in all cheese samples during the ripening process

whereas it decreased in the E sample produced using UF-raw milk and chymosin. On the 30th day of the ripening period, the lowest TCA value was determined in the F sample produced using UF-raw milk and microbial enzyme whereas the highest value was obtained from the A cheese sample produced using chymosin enzyme and the starter culture with high proteolytic activity. On the 90th day of ripening, the lowest TCA-SN value was determined in the E cheese sample produced using UF-raw milk and chymosin whereas the highest TCA-SN value was determined in the C cheese sample produced using chymosin enzyme and the starter culture with low proteolytic activity. The ripening index values were found to be higher than 7 in the A cheese sample which also had the highest bitterness value and the C sample which had a lower bitterness value.

Alizadeh et al. (2006) have reported that the rennet had a significant effect on the nitrogen dissolved in TCA in Iranian white cheese ($p < 0.05$). Karaca (2007) and Soltani (2013) have reported that, in UF White cheeses produced using different concentrations of salt, the nitrogen

soluble in 12% TCA value increased during the ripening process.

An increase was observed in 5% PTA in all cheese samples during the ripening period. On the 30th and 90th days of the ripening, the lowest 5% PTA value was determined in the D cheese sample produced using the starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme whereas the highest 5% PTA value determined in the F cheese sample produced using UF-raw milk and microbial enzyme. There were no significant changes in the ripening index values according to the soluble protein ratio in 5% PTA.

Tuncel *et al.*, (2010) have reported that the PTA ratio increased from 0.75 to 2.76 during the ripening period in Ezine cheese during the ripening period. Numerous researchers have reported that 5% PTA-SN increased during ripening.

UF White cheese samples showed an increase in acid degree values during the ripening period (Table 4).

Table 4. Acid Degree values of the UF White Cheese

Cheese samples	Acid degree value ripening (mg KOH g ⁻¹)		
	1. day	30. day	90. day
A	2.31	5.53	7.00
B	1.78	3.68	5.18
C	2.10	3.8	5.05
D	1.79	3.49	4.34
E	4.41	8.53	16.48
F	5.11	12.26	13.04

A cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme, B cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme, C cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme, D cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme, E cheese sample: Raw milk by chymosin enzyme, F cheese sample: Raw milk by microbial enzyme.

In the cheese samples produced using UF-raw milk and UF-pasteurized milk, acid degree values were higher in cheeses produced using chymosin. In the 90-day ripening period, the lowest acid degree value was found in the D cheese sample whereas the highest acid degree value was found in the E cheese sample. Çelik and Türkoğlu (2007), in the Örgü cheese samples produced

using raw and pasteurized cow milk, found that the acid degree value was lower on the 90th of the ripening period in the cheese samples produced with pasteurized milk.

Sensory properties of cheese

At the end of the 90-day ripening period, when the taste and flavor sensory scores of UF White

cheeses were examined, cheese samples produced with UF pasteurized milk (A, B, C, D) had the lowest score of A and C cheese samples. The cheeses made from raw milk (E; F) were not taken into sensory evaluation. The organoleptic evaluation results indicated that flavor of A and C cheese samples were bitterness taste is felt. These

results were pointed in Fig. 1. The highest rate of bitterness was observed in the A cheese sample produced by chymosin enzyme and starter culture with high proteolytic activity. C cheese sample were observed less bitterness taste than A cheese samples.

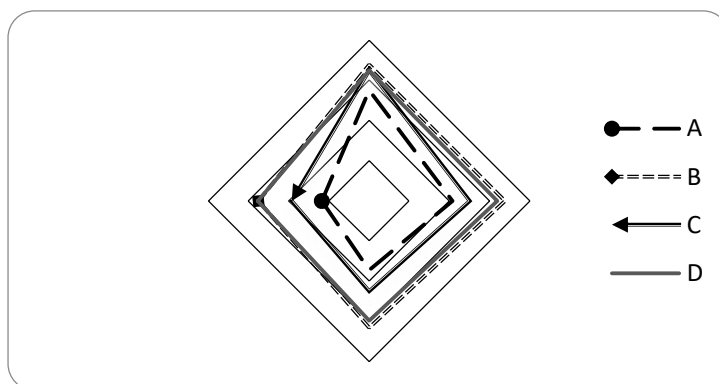


Figure 1. Flavor properties of UF-white cheese at day 1-90

A cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme,
 B cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme,
 C cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme,
 D cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

The gel obtained after the electrophoresis procedure carried out to determine the level of proteolysis and monitoring the hydrolysis of casein was transferred to the digital media using a scanner and then the changes in α s-casein, β -

casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin values were densitometrically determined using Bio-Rad molecular analyst (Image Lab Software Version 5.2). The electrophoresis gel image of the cheese samples is given in Figure 2 while the changes in protein ratios (%) are given in Table 5.

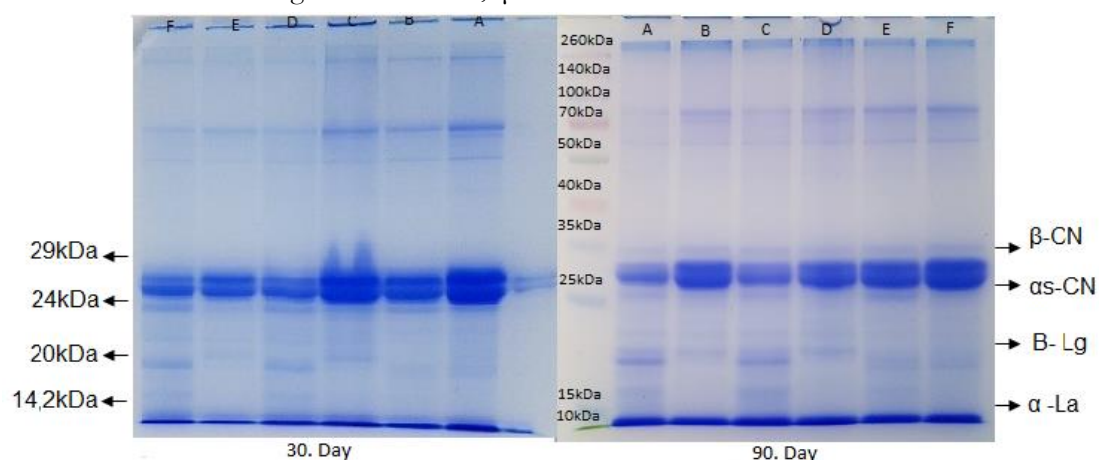


Figure 2. SDS Page profiles in UF cheese sample

Data are presented as, A: ^a +I, B: ^b +I, C: ^a +II, D: ^b +II, E: UF raw milk+^a, F: UF raw milk+ ^b
 I: starter culture with high proteolytic activity, II: starter culture with low proteolytic activity
^a : 100% Chymosin, ^b:*Mucor miehei proteas*,

As seen in Figure 2, α s-casein and β -casein bands were dense on day 30 of the ripening period in the A and C cheese samples. On day 90, casein hydrolysis started, and the density of these bands

decreased with the breakdown of α s-casein and β -casein.

Table 5. The variations of casein ratio in UF cheese samples (%) (n=4)

Cheese samples	Casein %	Ripening time		% The variations of casein ratio
		30 day	90.day	
A	α - casein	44.1 \pm 1.36	12.23 \pm 1.41	-72.26
	β - casein	32.45 \pm 3.11	26.14 \pm 0.32	-19.44
B	α - casein	48.24 \pm 1.31	33.14 \pm 0.89	-31.30
	β - casein	30.03 \pm 1.76	30.76 \pm 1.18	+2.43
C	α - casein	39.01 \pm 2.14	26.91 \pm 0.36	-31.02
	β - casein	38.52 \pm 5.93	26.11 \pm 0.39	-32.22
D	α - casein	44.32 \pm 2.37	35.41 \pm 1.44	-20.10
	β - casein	32.66 \pm 1.32	29.93 \pm 2.09	-8.36
E	α - casein	44.94 \pm 2.77	38.16 \pm 1.21	-15.09
	β - casein	32.3 \pm 5.74	27.85 \pm 0.66	-13.78
F	α - casein	37.41 \pm 1.62	35.14 \pm 0.97	-6.07
	β - casein	33.93 \pm 8.59	23.32 \pm 0.78	-31.27

A cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme, B cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme, C cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme, D cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme, E cheese sample: Raw milk by chymosin enzyme, F cheese sample: Raw milk by microbial enzyme

During the ripening period, a decrease was observed in the percentile values of α s-casein and β -casein in cheese samples. In the A cheese sample, produced with UF pasteurized milk, which had the highest bitterness value in sensory evaluations, α s-casein decreased by 72.26% on day 90 compared to that on day 30, while β -casein ratio decreased by 19.44%. The β -casein ratio remained constant only in the B cheese sample produced only using a microbial enzyme (Table 5). Caseins have hydrophilic properties as well as hydrophobic parts. The C-terminal exhibits hydrophilic properties. Hydrophobic properties are known to cause bitterness (Fox and Brodtkorb, 2008).

Karaca (2007), has reported that, in the white cheese, α s₁-caseins were more hydrolyzed than β -caseins, the proteolytic enzyme-containing cheese samples in the ratio of α s₁-casein were more

fragmented compared to the control cheese sample.

Soltani (2013) has concluded that, on the first day of ripening, no significant differences were determined between the electrophoretogram bands in UF White cheese samples, α s₁-casein and β -casein were hydrolyzed after day 45 and, with the increase in salt ratios on day 45 and 90, a reduction was determined in the hydrolysis products of α s₁- casein. Akhgar et al. (2016) have reported that α s₁-casein is hydrolyzed faster than β -casein during 60 days of ripening period in Iranian UF White cheese. Al-Otaibi and Wilbey (2005, 2006), have concluded that the rate of α s₁-casein hydrolysis increased during the 15-week ripening process in UF White cheese using chymosin at different ratios.

Hesari et al. (2006) in Iranian UF White cheese produced without adding starter cultures,

compared the electrophoretic patterns in three types of cheese and have reported that β -casein degradation was negligible whereas α _{s1}-casein was hydrolyzed to α _{s1}-CN (f24-199). It was determined that, compared to the control samples, there was an α _{s1}-casein hydrolysis in cheese samples with no starter culture, α _{s1}-casein remained intact in samples produced without using a coagulating enzyme, α _{s1}-CN (f24-199) was not produced after one and two months of ripening. As a result, the researcher has stated that, in Iranian UF white cheese, the first proteolysis of casein was mainly carried out by enzymes in the coagulant. In Iranian UF White cheese produced without using a coagulating enzyme, it has been stated that milk acid proteinase cathepsin D, which should have a chymosin-like effect on the degradation of α _{s1}-casein in white cheese, had a little contribution. Fathollahi et al. (2010) reported that the breakdown of β -casein and α _{s1}-casein in UF cheese has been an evident factor in textural changes of Iranian UF White cheese.

Changes in the Peptide Profile

RP-HPLC technique is used to determine ripening in cheese. The number of peaks, heights, hydrophilic and hydrophobic areas in the chromatogram provides information about the cheese proteolysis (Topçu, 2004). Hydrophilic

peptides yield chromatograms earlier than hydrophobic peptides do. Low-molecular-weight peptides and free amino acids are eluted at minute 10-40 of the retention time (Engels and Visser, 1994; Soltani, 2013).

Proteolysis is the most important and complex biochemical event that occurs during the ripening in most cheese types. In addition to softening of cheese, cheese flavor develops with the contribution of proteolysis, the formation of amino acids and peptides that directly contribute to the aroma of cheese (Katsiari et al., 2000). The high hydrophobicity of α _{s1} and β -casein are among the reasons for the formation of bitter taste as a result of hydrolysis (Fox et al., 1995). It has been reported that α _{s1} and β -casein may be the source of the bitter peptides produced by proteinases found in the cell walls of the starter bacteria while rennet can produce bitter-tasting peptides from all casein fractions (Lemieux and Simard, 1991).

The changes in the area formed by the hydrophilic and hydrophobic peptides formed according to the HPLC results on day 30 and 90 of the ripening period of the cheese samples are shown in Table 6.

Table 6. The changes the hydrophilic and hydrophobic areas in UF cheese samples (n=2)

Cheese samples	Ripening time (d)	Hydrophilic areas	% variations	Hydrophobic areas	% variations
A	30	253.775.370	+38	836.313.410	+106
	90	349.961.794		1.723.737.389	
B	30	205.637.457	+80	963.426.789	+41
	90	370.988.666		1.362.504.949	
C	30	264.565.060	+12	1.441.623.572	-6
	90	296.539.601		1.353.039.704	
D	30	243.725.032	+55	1.452.444.292	+14
	90	377.096.366		1.655.199.525	
E	30	252.667.631	+12	1.319.441.962	-18
	90	283.525.132		1.087.225.719	
F	30	217.761.973	+76	1.372.067.507	-12
	90	382.842.080		1.212.097.909	

A cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and chymosin enzyme, B cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with high proteolytic activity and microbial enzyme, C cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and chymosin enzyme, D cheese sample: Pasteurized milk using starter culture with low proteolytic activity and microbial enzyme, E cheese sample: Raw milk by chymosin enzyme, F cheese sample: Raw milk by microbial enzyme.

As seen in Table 6, the highest increase in the hydrophobic area was observed in the A cheese sample (106%) produced using UF-pasteurized milk, chymosin enzyme and the starter culture with high proteolytic activity.

No significant changes were observed in the hydrophilic and hydrophobic areas in the C cheese sample produced using chymosin enzyme and the starter culture with low proteolytic activity where increases were observed in the hydrophilic areas in the B and D cheese samples produced using the microbial enzyme. Decreases were observed in the hydrophobic area in the E and F

cheese samples produced using UF raw milk whereas an increase was observed in the hydrophilic area in the F cheese sample. In the cheese samples produced with UF-raw milk, it was determined that protein degradation was high on day 30, due to the high microorganism load, whereas it decreased on day 90.

A comparison of HPLC-chromatograms of the A cheese sample which had bitter sensory properties and the D cheese sample D which had no bitter sensory properties is given in Figure 3.

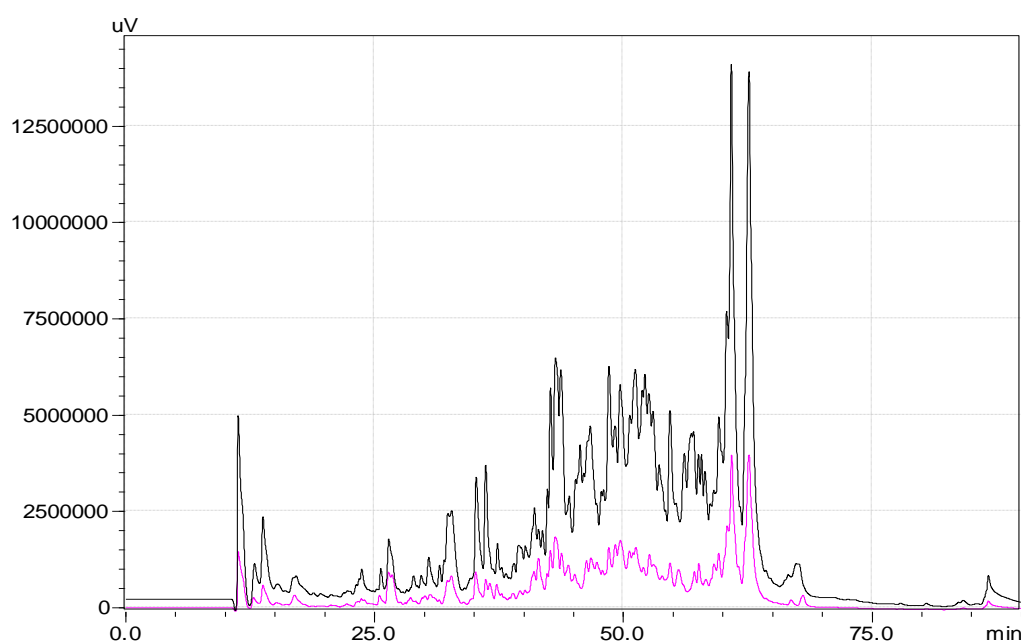


Figure 3. Reverse-phase high performance liquid chromatograms (A214 nm) in the A and D cheese samples

Black peak: A cheese sample day 90

Pink peak: D cheese sample day 90

In Figure 3, it was seen that the number of hydrolysis products increased after 45 minutes in the A cheese sample. There were increases in peaks in the A sample at minute 52 and 56.

Öner (2015) has reported that the levels of hydrophobic and hydrophilic peptides and their ratios changed significantly during ripening in White cheese. Hesari et al. (2006) have found that starter culture affected the production of hydrophilic peptides. Agboola et al. (2004) have

stated that the level of hydrophobic peptides in the cheese produced using microbial enzyme was the lowest at the end of the ripening process (30-90 days). The researchers found that the ratio of hydrophobic peptides to hydrophilic peptides was the lowest. The researchers have also reported that the hydrophobic peptide levels measured at 214 nm increased between days 7 and 60 in cheese samples produced using microbial enzyme whereas decreased between days 60 and 90. In

addition, in all the cheeses produced using abomasum rennet, hydrophobic peptides increased during the ripening process.

Hesari et al. (2006), in their study on Iranian UF White cheese samples, have stated that the most important difference between ethanol-insoluble fractions of the peptide profiles of the control cheeses and the cheeses produced using with no starter culture was that the retention time occurred between minutes 10 and 30. During this period, the peptide concentration in the cheeses produced using with no starter culture was lower than that of the control group.

Soltani (2013) has reported that there were no significant differences between the samples in the peptide profiles of UF White cheeses in the first 20 minutes of the retention time during the ripening period. The researcher has stated that the differences between the samples in the peptide profiles of UF White cheeses were detected in 20-60 minutes in the retention time and that the peak concentration decreased as the salinity increased.

Akhgar et al. (2016) and Banihashemi et al. (2020) have reported that the HPLC chromatograms of the soluble fractions of slurry-added UF White cheese and the control cheese at pH 4.6 showed significant differences in terms of peptide profiles. The researcher has stated that the peptides formed at retention times of 22.5, 28.7, 36, 60, 66 and 68 minutes, the peaks observed during the retention time of 22.5-36 minutes were of low-molecular-weight-peptides and free amino acids whereas peaks of the hydrophobic peptides formed at later retention times.

Al-Otaibi and Wilbey (2005) using different rates of chymosin enzyme and salt in the process of UF White cheese showed that bitterness taste was occurred from the 12th week. They reported that this was caused by proteolytic enzymes, starter cultures and low salt content.

CONCLUSION

The changes in the protein content during the ripening process were statistically significant ($P < 0.05$). According to the protein content soluble

in TCA, the highest ripening value was determined in the A and C cheese samples. These samples were also determined to have bitterness. A significant increase was observed in the hydrophobic peptide values in the A samples which had the highest bitterness values during the 90-day ripening period.

In the A and C cheese samples in which bitterness were detected, it was determined by the SDS-Page that the α s-casein and β -casein bands were dense on day 30, whereas, on day 90, the density of these bands decreased with the onset of casein hydrolysis. The ratios of α s-casein and β -casein decreased during storage in all UF White cheese samples however there were no changes in the ratio of β -casein in the B cheese sample produced using microbial enzyme and the starter culture with high proteolytic activity. The highest decrease in the β -casein ratio was found in the C cheese sample (32.22%) produced using chymosin enzyme and starter culture with low proteolytic activity. The highest increase in the hydrophobic area was observed in the A cheese sample (106%) produced with UF pasteurized milk, using chymosin enzyme and the starter culture with high proteolytic activity.

As a result, it was determined that the use of chymosin enzyme and the starter culture with high proteolytic activity in the production of UF White cheese caused a decrease in protein ratio whereas it increased proteolysis. Furthermore, the rate of α s-casein degradation increased, and hydrophobic peptides increased during the ripening period. On the other hand, it was determined that α s-casein degradation rate decreased, and an increase was observed in the hydrophilic area in the case where microbial enzyme and the starter culture with low proteolytic activity were used.

Therefore, it was determined that the use of microbial enzyme and the starter culture with low proteolytic activity in UF White cheese production and carrying out the production procedure at the appropriate temperature is important for the prevention of bitterness in cheese.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by SDU BAP project number 4869 YL1-17. We would like to thank to SDU-BAP group for supporting to the project.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Zübeyde Öner: Contributed as the thesis supervisor. The Master's thesis student Zerrin Arısoy carried out the preparation of samples, analyses, reporting, and writing and correction of literature sources. Both of authors were responsible for interpretation and discussion of the results. Both of authors approved the submitted version.

REFERENCES

- Agboola, S., Chen, S., Zhao, J. (2004). Formation of Bitter Peptides During Ripening of Ovine Milk Cheese Made With Different Coagulants. *Dairy J*, 84: 567- 578, doi: 10.1051/lait:2004032.
- Akhgar, R.N.R., Hesari, J., Damirchi, S.A. (2016). Effect of Slurry Incorporation into Retentate on Proteolysis of Iranian Ultrafiltered White Cheese. *J Food Sci*, 34: 173-179, 10.17221/361/2015-CJFS.
- Alizadeh, M., Hamed, M., Khosroshahi, A. (2006). Modeling of Proteolysis and Lipolysis In Iranian White Brine Cheese. *Food Chem*, 97(2): 294-301, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.05.009.
- Al-Otaibi, M.M., Wilbey, R.A. (2005). Effect of Chymosin and Salt Reduction on the Quality of Ultrafiltered White-Salted Cheese. *J Dairy Res*, 72:234-242, doi: 10.1017/S0022029905000762.
- Al-Otaibi, M.M., Wilbey, R.A. (2006). Effect of Chymosin Reduction and Salt Substitution on the properties of White Salted Cheese. *Int Dairy J*, 16: 903-909, doi: 10.1016/j.idairyj.2005.08.006.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis, 15th Ed., Association of Official Analysis Chemists: Arlington, VA, USA
- Arısoy, Z., Öner, Z. (2019). Ultrafiltrasyon Tekniği İle Üretilen Beyaz Peynirlerin Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Farklı Pihılaştırıcı Enzimlerin Etkisi [The Effect of Different Coagulation Enzymes on the Chemical and Microbiological Properties of Ultrafiltered White Cheese] *Kerkelareli University J Eng Sci*, 5(1): 68-86, doi: 10.34186/klujes.565223.
- Banihashemi, S.A., Nikoo, M., Ghasempour, Z., Ehsani, A. (2020). Bioactive peptides fractions from traditional Iranian Koopeh cheese; lactic fermentation products. *Biocatalysis Agric Biotechnol*, 29: 101798, doi: 10.1016/j.bcab.2020.101798.
- Cinbaş, T. (2004). İki Farklı Üretim Yöntemiyle Üretilen Beyaz Peynirlerde Proteoliz ve Lipoliz [Proteolysis and Lipolysis in White Cheese Produced by Two Different Production Methods], Istanbul Technical University Master thesis, Istanbul, Turkey, 66p.
- Çelik, Ş., Türkoğlu, H. (2007). Ripening of Örgü Cheese Manufactured with Raw or Pasteurized Milk: Composition and Biochemical Properties. *Int J Dairy Technol*, 60(4): 253-258, doi: 10.1111/j.1471-0307.2007.00344.x.
- Donkor, O.N., Henriksson, A., Singh, T.K., Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2007). ACE Inhibitory Activity of Probiotic Yoghurt, *Int Dairy J*, 17: 1321-1331, doi: 10.1016/j.idairyj.2007.02.009.
- Engels, W.J.M., Visser, S. (1994). Isolation and Comparative Characterization of Components That Contribute to the Flavor of Different Types of Cheese. Netherlands, *Milk Dairy J*, 48: 127-140.
- Fathollahi, I., Hesari, J., Azadmard, S., Oustan, S. (2010). Influence of Proteolysis and Soluble Calcium Levels on Textural Changes in The Interior and Exterior of Iranian UF White Cheese During Ripening. World Academy of Science, Engineering and Technology. *Int J Nutr Food Eng*, 66: 399-404, doi: 10.5281/zenodo.1076508.
- Fox, P.F., Brodtkorb, A. (2008). The Casein Micelle Historical Aspects, Current Concepts and Significance. *Int Dairy J*, 18: 677-684, doi: 10.1016/j.idairyj.2008.03.002.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Singh T.K. (1995). Methods for Assessing Proteolysis in Cheese during Maturation. In: *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*, Springer, Boston, MA, pp: 161-194.

- Güven, M., Karaca, O.B. (2001). Proteolysis Levels of White Cheese Salted and Ripend in Prepared from Various Salt. *Int J Dairy Technol*, 54(1): 29-33, doi: 10.1046/j.1471-0307.2001.00003.x.
- Hayaloğlu, A.A., Guven, M., Fox, P.F., Hannon, J.A., McSweeney, P.L.H. (2004). Proteolysis in Turkish White-Brined Cheese Made with Defined Strains of *Lactococcus*. *Int Dairy J*, 14: 599-610, doi: 10.1016/j.idairyj.2003.12.008.
- Hayaloğlu, A. A., Özer, B. (2011). Peynirde Olgunlaşma [Ripening in cheese]. In: *Peynir Biliminin Temelleri* (173-203), Hayaloğlu A.A. ve Özer B. (Ed.), Sidas, İzmir, pp: 173-203.
- Hesari, J., Ehsani, M.R., Khosroshahi, A., McSweeney, P.L. (2006). Contribution of Rennet and Starter to Proteolysis İn Iranian UF White Cheese. *Dairy J*, 86: 291-302, doi: 10.1051/lait:2006011.
- IDF. (1993). Milk, Determination of Nitrogen Content, FIL-IDF 20B, Brussels, Belgium.
- Jarrett, W.D., Aston, J.W., Dulley, J.R. (1982). A Simple Method for Estimating Free Amino Acids in Cheddar Cheese. *Aust J Dairy Technol*, 37 (2): 55.
- Karaca, O.B. (2007). Mikrobiyel Kaynaklı Proteolitik ve Lipolitik Enzim Kullanımının Beyaz peynirlerin Özellikleri ve Olgunlaşmaları Üzerine Etkileri [Effects of Using of Proteolytic and Lipolytic Enzyme on Properties of White Cheeses] Çukurova University Food Engineering, Adana, Turkey, 149 p.
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaei, K., Safari, M. (2009). Changes in The Rheological Properties of Iranian UF-Feta Cheese During Ripening. *Food Chem*, 112(3): 539-544, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.003.
- Katsiari, M.C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.P., Roussis, I.G. (2000). Proteolysis in Reduced Sodium Feta Cheese Made by Partial Substitution of NaCl by KCl. *Int Dairy J*, 10: 635-646, doi: 10.1016/S0958-6946(00)00097-2.
- Kılıç, S., Eren Vapur, U. (2003). Peynirde Acılık Problemi, Etki Eden Faktörler ve Kontrol Altına Alınması [Bitter Flavor Development in Cheese, Factors Likely to Infflence and Control of Cheese Bitterness]. *Bilimsel Gıda*, 4: 35-37.
- Kuchroo, C.N., Fox, P.F. (1982). Soluble Nitrogen in Cheddar Cheese Comparison of Extraction Procedures. *Milchwissenschaft*, 37(6): 331-335.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, doi: 10.1038/227680a0.
- Lemieux, L., Simard, R. E. (1991). Bitter Flavour in Dairy Products I. A Review of the Factors Likely to Influence its Development Mainly in Cheese Manufacture. *Lait*, 71: 599-636.
- Öner, Z. (2015). Beyaz, Kaşar ve Tulum Peynirinde Biyoaktif Peptitlerin Belirlenmesi ve Tanımlanması [Identification and Characterization of Bioactive Peptides in Beyaz, Kashar, and Tulum cheeses], TÜBİTAK Project Report, 137 p.
- Peppas, C.P., Kanolly, E., Voutsinas, L.P., Mallatou, H. (1996). Effect of starter level draining time and aging on the physicochemical, organoleptic and rheological properties of feta cheese. *J Soc Dairy Technol*, 49: 73-79, doi: 10.1111/j.1471-0307.1996.tb02494.x
- Polychroniadou, A., Michaelidou, A., Paschaloudis, N. (1999). Effect of Time, Temperature and Extraction Method on the Trichloroacetic Acid-Soluble Nitrogen of Cheese. *Int Dairy J*, 9(8): 559-568, doi: 10.1016/S0958-6946(99)00122-3.
- Renner, E. (1986). *Milchpraktikum Skriptum zu den Übungen*. Justus-Liebig-Universität
- Sharafi; S., Nareghi, L., Eyvazzade, O., Ebrahimi, M.T.A. (2020). The Physicochemical, Texture Hardness and Sensorial Properties of Ultrafiltrated Low Fat Cheese Containing Galactomannan and Novagel Gum. *Acta Sci Polo Technol Aliment*, 19(1): 83-100, doi: 10.17306/J.AFS.2020.0685.
- Soltani, M. (2013). İran'da Üretilen Ultrafiltre Beyaz Peynirin Özellikleri Üzerine Tuz Oranı ve Depolama Süresinin Etkileri [Effects of Salt Ratio and Storage Time on Properties of Ultrafilter

- White Cheese Produced in Iran] Çukurova University PhD thesis, Adana, Turkey, 168 p.
- Soltani, M., Boran, O.S., Hayaloğlu, A. A. (2016). Effect of Various blends of Camel Chymosin and Microbial Rennet (*Rhizomucor miehei*) on Microstructure and Rheological Properties of Iranian UF White Cheese. *LWT -Food Sci Technol*, 68: 724-728, doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.028
- Sousa, M.J., Ardo, Y., Mcsweeney, P.L.H. (2001). Advances in the Study of Proteolysis during Cheese Ripening. *Int Dairy J*, 11: 327-345, doi: 10.1016/S0958-6946(01)00062-0.
- Topçu, A. (2004). Kaşar ve Beyaz Peynirlerde Acılaşıma Yol Açan Peptidlerin Saptanması ve Starter Kültürlerin Etkisinin İncelenmesi [Determination of Peptides Causing Bitter in Cheddar and White Cheeses and Investigation of the Effects of Starter Cultures] Hacettepe University PhD thesis, Ankara, Turkey, 158 p.
- Tuncel, N.B, Güneşer, O., Engin, B., Yaşar, K., Zorba, N.N., Karagül-Yüceer, Y. (2010). Ezine Peyniri II. Olgunlaşma Süresince Proteoliz Düzeyi. *J Food*, 35(1): 1-6.
- Üçüncü, M. (2008). *A'dan Z'ye Peynir Teknolojisi* [Cheese Technology from A to Z] Meta Basım Matbaası 2. Press 1236p İzmir, Turkey.
- Yıldırım, Z., Atamer, M., Yıldırım, M. (2011). Peynirde Kalite Faktörleri [Quality Factors in Cheese]. In: *Peynir Biliminin Temelleri*, Hayaloğlu A.A. ve Özer B. (Ed.), Sidas, İzmir, Turkey, pp: 417-447.



BEYAZ PEYNİR MİKROBİYOTASINDA KÜLTÜROMİK VE SHOTGUN METAGENOMİK TEKNOLOJİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Zeynep Görkem Cerit^{1,2}, Mehmet Cengiz Baloğlu³, Remziye Yılmaz^{1,*}

¹ Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe Kampüsü, 06800, Ankara

² Kastamonu Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Kastamonu

³ Kastamonu Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Kastamonu

Geliş / Received: 07.12.2020; Kabul / Accepted: 24.03.2021; Online baskı / Published online: 08.04.2021

Cerit, Z.G., Baloğlu, M.C., Yılmaz, R. (2021). Beyaz peynir mikrobiyotasında kültüromik ve shotgun metagenomik teknolojilerin değerlendirilmesi. *GIDA* (2021) 46(3) 566-582 doi: 10.15237/gida.GD20136

Cerit, Z.G., Baloğlu, M.C., Yılmaz, R. (2021). Evaluation of culturomic and shotgun metagenomic technologies in white cheese microbiota. *GIDA* (2021) 46(3) 566-582 doi: 10.15237/gida.GD20136

ÖZ

Omik teknolojiler; DNA, RNA, genler, proteinler ve metabolitlerin araştırılması için kullanılan araçlar ve metotlardan oluşan sistematik yöntemler bütünüdür. Son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasında ve işlevlerinin belirlenmesinde genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik alanlarda yapılan çalışmalar artış göstermektedir. Genomik ve transkriptomik çalışmalar kapsamında mikroorganizmaların genom dizilerinin belirlenmesinde ve gen ifade analizlerinde yeni nesil dizileme sistemleri ile biyoinformatik araçlar birlikte kullanılmaktadır. Bu çalışmada, beyaz peynirin taşıdığı toplam mikrobiyel yükün oluşturduğu beyaz peynir mikrobiyotasının belirlenmesinde, kültürden bağımsız bir yöntem olan shotgun metagenomik ile kültüre dayalı bir yöntem olan ve mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlayan kültüromik metotları üzerinde durulmuştur. Çalışma ile yakın gelecekte beyaz peynir gibi geleneksel gıda ürünlerinin yeni teknikler değerlendirilerek araştırılması gerekliliğinin önemi vurgulanmıştır. Kültüromik, metagenomik gibi yenilikçi teknikler, geleneksel gıda ürünlerinin mikrobiyota tanımlanması üzerinde daha az belirsizlik ile çalışılmasına olanak sağlayabilmektedir.

Anahtar kelimeler: beyaz peynir, mikrobiyota, omik teknolojiler, metagenomik, kültüromik.

EVALUATION OF CULTUROMICS AND SHOTGUN METAGENOMIC TECHNOLOGIES IN WHITE CHEESE MICROBIOTA

ABSTRACT

Omics technologies are a set of systematic methods consisting of tools and applications used to investigate genes, DNA, RNA, proteins and metabolites. In recent years, genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics have been mainly utilized in the identification and determination of microorganisms. Within the scope of genomic and transcriptomics studies, next generation sequencing systems and bioinformatics tools are used together to determine the genome sequences of microorganisms and gene expression analysis, respectively. In this study, shotgun metagenomics, the culture-independent method, and culture-dependent culturomics approach that allows identification of microorganisms are emphasized for the detection of white cheese microbiota. The study has been emphasized the importance of researching traditional food products such as white

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: remziye06@gmail.com

Zeynep Görkem Cerit; ORCID no: 0000-0003-3955-9584

Mehmet Cengiz Baloğlu; ORCID no: 0000-0003-2976-7224

Remziye Yılmaz; ORCID no: 0000-0003-2041-1205

cheese by evaluating new techniques in the future. Innovative techniques such as culturomics and metagenomics can enable the study of traditional food products to be studied with less uncertainty on the microbiota identification.

Keywords: white cheese, microbiota, omic technologies, metagenomics, culturomics.

GİRİŞ

Beyaz peynir mikrobiyotası, peynir üretim sürecinde önemli bir rol oynar ve peynirin kendine özgü tat ve koku gibi organoleptik özelliklerinin oluşmasında etkilidir (Jonhalla vd., 2018). Endüstride beyaz peynir üretimi için kullanılan laktik asit bakterilerinden oluşan starter kültür karışımları, sütte asitlik geliştirilmesinin yanında beyaz peynirin tat ve koku bileşiklerini oluşturmada görev alırlar. Endüstriyel beyaz peynir üretiminde çiğ süte uygulanan ısı işlemi ile çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların tamamının yok edilmediği bildirilmiştir (Kable vd., 2016). Bunun yanında beyaz peynir üretim işletmelerinde peynirin temas ettiği ekipmandan peynire çeşitli mikroorganizmalar geçebilmektedir. Bu sebeple peynir mikrobiyotasına starter kültürün yanında peynire işlenen sütün mikrobiyotası ve işletme ekipmanının taşıdığı mikrobiyel yükün de etkisi olabileceği bildirilmiştir (Stellato vd., 2015). Starter kültür olmayan ve çiğ süt ve/veya çevresel kaynaklardan mikrobiyotaya katılan laktik asit bakterilerinin de beyaz peynirin organoleptik özellikleri ve besinsel içeriğinin gelişimine katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (Wolfe vd., 2014).

Mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan klasik kültürel yöntemlerin yanı sıra son yıllarda omik teknolojilerde yaşanan gelişmeler mikrobiyota çalışmalarının daha doğru ve kesin bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlamıştır (Jonhalla vd., 2018; Escobar- Zepeda vd., 2018). Metagenomik, çevresel bir örnekte bulunan tüm genomların doğrudan izole edilerek genetik analizinin gerçekleştirilmesi olarak tanımlanabilir (Escobar-Zepeda, 2015; Chiu vd., 2019). Genetik materyalin dizilmesiyle gerçekleştirilen metagenomik analizlerde yeni nesil sekanslama yöntemleri kullanılmaktadır. Kültüromik ise seçici besiyerlerinde farklı ortam şartlarında geliştirilen ve saf kültür olarak elde edilen izolatların Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile tanımlanmasına olanak sağlayan bir yaklaşımdır (Garcia vd., 2016).

Bu çalışmanın amacı, bütünlük omik yaklaşımı ile beyaz peynir üretim sürecine ilişkin süt, peynir ve çevre mikrobiyotasının dinamikleri hakkında laktik asit bakterileri açısından kapsamlı genel bir bakış sağlamaktır. Ayrıca bir mikrobiyota çalışmasında kültüre dayalı ve kültürden bağımsız iki yöntemin karşılaştırılmasının önemi üzerinde durulacaktır.

Beyaz Peynir

Peynir, sütün enzimler ya da organik asitler kullanılarak pıhtılaştırılması, oluşan pıhtının baskılanarak peynir altı suyunun ayrılmasıyla oluşan, farklı yağ oranlarında ve farklı sertliklerde olabilen, çeşidine göre değişen renk, tat ve koku özelliklerine sahip bir süt ürünüdür. Dünyada 1000'in üzerinde, Türkiye'de ise 50'ye yakın peynir çeşidinin olduğu bildirilmiştir (Togay vd., 2020). TEPGE Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporu ve Ulusal Süt Konseyi Süt Raporuna göre ülkemizde en çok tüketilen ve pazar payı en yüksek olan peynir çeşidi beyaz peynirdir (Anonymous, 2017; Anonymous, 2018). TÜİK Süt ve Süt Ürünleri Üretim İstatistikleri 2020 Mart ayı raporuna göre Türkiye'de inek sütünden üretilen peynir miktarı bir önceki yılın bahsedilen ayına kıyasla %12,2 artış göstererek 63300 ton, manda, koyun ve keçi sütlerinden üretilen diğer peynirlerin üretimi ise %14,8 azalarak 2700 ton olmuştur (TÜİK, 2020). Türk Gıda Kodeksi Peynir Tebliği (Tebliğ No: 2015/6) uyarınca beyaz peynir "Hammaddenin peynir mayası kullanılarak pıhtılaştırılması ile elde edilen telemenin tekniğine uygun olarak işlenmesiyle üretilen, üretim aşamalarındaki farklılıklara göre taze veya olgunlaştırılmış olarak tanımlanabilen, çeşidine özgü karakteristik özellikler gösteren salamuralı peynir" olarak tanımlanmaktadır. Çizelge 1'de Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Tebliğ No: 2009/68) uyarınca beyaz peynirin uyması gereken mikrobiyolojik kriterlere yer verilmiştir.

Çizelge 1. Beyaz peynirin mikrobiyolojik kriterleri

Gıda	Mikroorganizmalar	Numune alma planı		Limitler (*)	
		n	N	m	M
Peynir (eritme peynir hariç diğer tüm peynirler)	Enterobacteriaceae	5	2	10 ³	10 ⁴
	<i>S. aureus</i> (**)	5	2	10 ²	10 ³
	<i>Salmonella</i> spp.	5	0	0/25 g-mL	
	<i>L. monocytogenes</i>	5	0	0/25 g-mL	
	<i>E. coli</i> O157:H7	5	0	0/25 g-mL	

(*) : Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-mL olarak değerlendirilir.

(**) : Koagülaz pozitif stafilocoklar. n: Analize alınacak numune sayısını

c: "M" değeri taşıyabilecek en fazla numune sayısını

m: (n - c) sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri

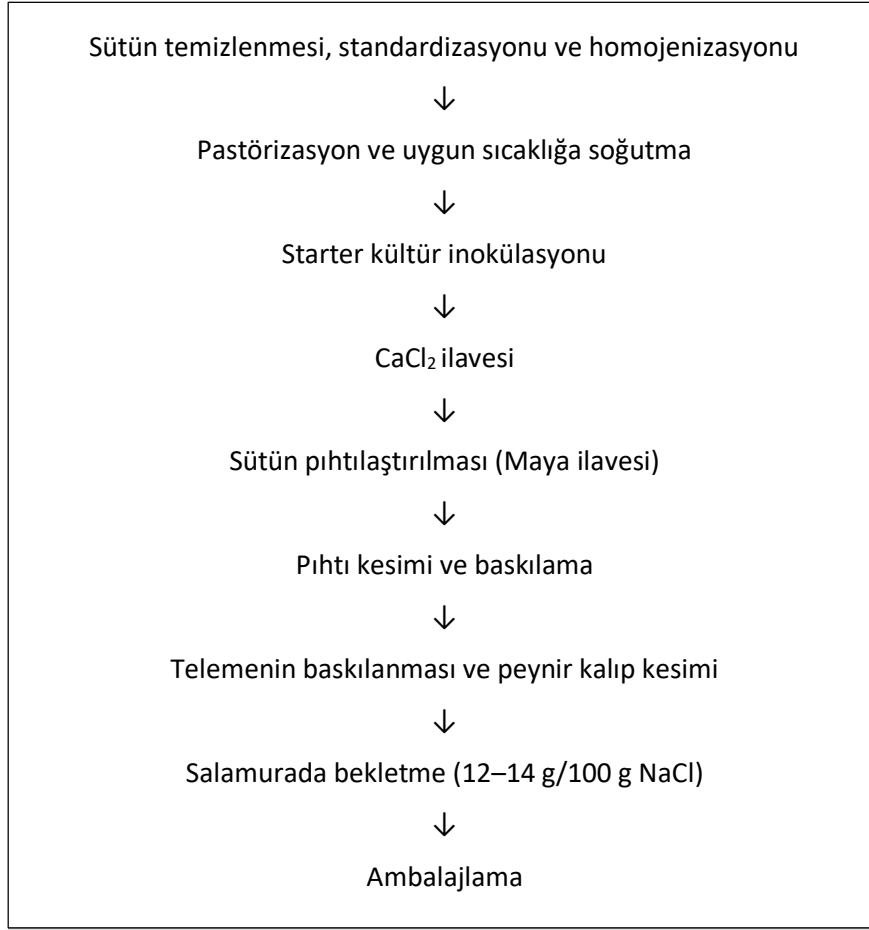
M: "c" sayıdaki numunede bulunabilecek en fazla değeri ifade etmektedir.

Endüstriyel Beyaz Peynir Üretimi

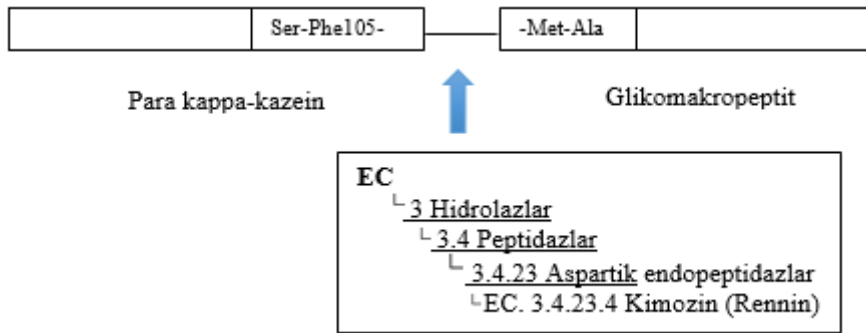
Beyaz peynirin kalitesi peynire işlenen sütün kimyasal kompozisyonuyla yakından ilişkilidir. Bu sebeple süt kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan iyi kalitede olmalıdır. Buna göre işletmeye gelen süt; antibiyotik, deterjan ve kimyasal kalıntı içermemeli, mastitisli olmamalı, kolostrum içermemeli, laktasyonun ilk ve son safhalarında elde edilmemelidir. Kimyasal bileşimi normal olmayan, özellikle mastitisli hayvanlardan elde edilen sütlerin serum proteini içeriği yüksek, kazein içeriği ise düşüktür. Düşük kazein içeriğine sahip süttten üretilen peynirin randımanı düşmekte ve peynirde yumuşama problemi oluşmaktadır. Mikrobiyel açıdan peynire işlenen süt, koliform, *Clostridium* ve *Bacillus* cinsi bakterileri içermemelidir (Hayaloğlu vd., 2002).

Şekil 1'de endüstriyel beyaz peynir üretimi akış şeması verilmiştir. Endüstriyel beyaz peynir üretiminde ilk olarak işletmeye gelen çiğ süt kalite kontrolünden geçtikten sonra çiğ süt tanklarına alınır. Süt, üretime alınmadan önce ilk olarak basit filtreler ile gözle görülen kirliliklerden, daha sonra merkezkaç kuvveti ile çalışan seperatörlerle gözle görünmeyen yabancı maddelerden ayrıştırılır. Temizlenen sütün protein ve yağ oranı ayarlanarak sütün standardizasyonu yapılır. Daha sonra süt yüksek basınç altında 60-65°C sıcaklıkta çok ince filtrelerden geçirilerek homojenizasyonu sağlanır. Homojenizasyon ile sütün içerdiği yağ globüllerinin çapı eşitlenir. Ön işlemlerin ardından süt 72-75°C'de 15 saniye ısıtılma maruz bırakılır ve hızlı bir şekilde 28-30°C'ye soğutulur. Sütün bu sıcaklığa soğutulmasının sebebi beyaz peynir starter kültürlerinin mezofilik özellikte laktik asit

bakterilerinden oluşması ve bu sıcaklıklarda optimum gelişmesidir. Starter eklendikten sonra süte CaCl₂ eklenir. Bunun sebebi pastörizasyonda yüksek sıcaklığın etkisiyle ayrılan Ca⁺²'nin yapıya tekrar kazandırılmasıdır. Starter kültürün etkisiyle pH 5.5'e geldiğinde süte rennet enzimi (peynir mayası) ilave edilir. Bu pH pıhtılaşmayı sağlayan rennet enziminin optimum aktivite gösterdiği pH'tır. Kazeinin dört alt biriminden biri olan kapa kazeinin sütün pıhtılaşmasında önemli bir yeri vardır. Rennet enzimi kapa kazeinin 105. amino asidi fenilalanin ve 106. amino asidi metiyonin arasındaki bağı kırar (Şekil 2). Kırılan zincirde hidrofobik olan kısım para kapa-kazein (para kapa-casein) yapıdan ayrılır ve pıhtıyı oluşturur. Hidrofilik kısım olan glikomakropeptit (GMP) ise serum kısmında çözünerek yapıdan ayrılır. Pıhtı oluştuktan sonra 1 cm³'lük küpler halinde kırılıp baskılanarak fazla suyunu bırakması sağlanır. Pıhtı baskılanırken cendere bezine sarılır ve üzerine ağırlık uygulanır. Cendere bezi beyaz peynirin bir yüzeyinde olan pütürlü şeklin oluşmasını sağlar. Pıhtının fazla suyunun alınmasıyla oluşan teleme 7 cm³'lük küpler halinde kesilir ve 24 saat salamurada (12-14 g/100 g NaCl) bekletilir (Hayaloğlu vd., 2002). Salamurada bekletildikten sonra beyaz peynir, tercihe bağlı olarak olgunlaştırılmadan tüketime sunulabilmektedir. Salamuranın ardından taze beyaz peynir ambalajlanarak yine salamura (6 g/100 g NaCl) içinde satışa sunulur. Olgunlaştırılarak tüketime sunulan beyaz peynirin olgunlaştırılması ise 4-8°C'de 60-90 gün yapılmaktadır (Topçu ve Saldamlı, 2006).



Şekil 1. Beyaz peynir üretimi.



Şekil 2. Kazein zincirinin kırılması.

Beyaz Peynir Mikrobiyotası

Mikrobiyota belirli ortamda bulunan mikrobiyel topluluğun tamamına verilen isimdir (Liu, 2016). Mikrobiyom tanımı, ilk kez Nobel ödüllü mikrobiyolog Joshua Lederberg tarafından 2001

yılında yapılmıştır (Prescott, 2017). Buna göre, insan vücudunda bulunan kommensal, simbiyotik ve patojen mikroorganizmalardan oluşan ekosistemi ifade eden terim “mikrobiyom” olarak tanımlanmıştır. Daha sonra mikrobiyota ve

mikrobiyom terimleri insan ve mikrobiyomu arasındaki etkileşimi açıklamayı hedefleyen İnsan Mikrobiyom Projesi (HMP) tarafından tekrar açıklanmıştır (Proctor vd., 2019). Günümüzde mikrobiyom, belirli bir ortamda bulunan bakteri, arkea, küf ve mayalardan oluşan mikrobiyel topluluğun oluşturduğu mikrobiyotanın toplam genomu olarak ifade edilmektedir (Knight vd., 2018).

Mikrobiyotanın bulunduğu konakçı ortamı insan, hayvan ya da bitki olabileceği gibi çevresel bir örnek de olabilir (Liu, 2016). Bu açıklamadan hareketle, bir peynir çeşidinin taşıdığı mikroorganizma topluluğu “peynir mikrobiyotası” olarak tanımlanabilir. Peynir mikrobiyotası, çok büyük oranda, kullanılan starter kültüre göre şekillenmektedir (Ercolini, 2004). Süt mikrobiyotası, peynir yapımında tüm süreçte önemli bir rol oynar ve peynire özgü lezzet ve doku gelişimine katkıda bulunur (Tilocca vd., 2019).

Starter kültürler ürüne istenilen tat, koku, aroma ve yapı gibi özellikleri kazandırmak amacı ile kullanılan ve bilinen özelliklere sahip karışık mikroorganizma kültürleridir. Bunun yanında, peynir üretiminde işletmeye gelen çiğ sütün taşıdığı mikroorganizmalar da peynir mikrobiyotası ile ilişkilidir. Çünkü çiğ sütte bulunan mikroorganizmaların tamamı pastörizasyon işlemi ile yok edilememektedir (Kable vd., 2016). Bu faktörlerin yanında peynir üretim işletmesinde peynirin temas ettiği ekipmandan peynire çeşitli mikroorganizmalar geçebilmektedir. Bu yüzden beyaz peynir mikrobiyotasını sadece eklenen starter kültür değil aynı zamanda çiğ süt mikrobiyotası ve işletme ekipmanlarının taşıdığı mikroorganizmalar gibi faktörler de etkilemektedir (Stellato vd., 2015).

Peynir mikrobiyotası, başlatıcı birincil mikroflora ve ikincil mikroflora olarak ikiye ayrılır (Tunail, 2009). Birincil mikroflora olan laktik asit bakterileri laktik asit fermantasyonuyla sütün asitliğini arttırırken olgunlaşma sürecinde de sahip oldukları enzimler sayesinde peynirin görünüş, tat, koku, tekstür gibi karakteristik özelliklerinin oluşumunu sağlarlar. İkincil mikroorganizmalar

ise olgunlaşma sürecinde çeşitli organik asitlerin oluşumuna önemli katkı sağlarlar. İkincil mikroflora peynir yüzeyinde ve/veya içinde gelişebilen başlatıcı kültür dışı laktik asit bakterileri, maya ve küflerden oluşabilmektedir. Günümüzde endüstriyel olarak üretilen beyaz peynirler genellikle taze peynir olarak olgunlaştırılmadan tüketime sunulmaktadır. Bu sebeple beyaz peynirin ikincil mikroflorası bulunmamaktadır (Tunail, 2009). Beyaz peynirin mikrobiyotasının oluşumunda ise starter kültür olarak kullanılan mikroorganizmaların yanında çevresel mikrobiyotanın, starter kültür olmayan mikroorganizmaların da etkisinin olabileceği bildirilmiştir (Jonhalla vd., 2018). Literatür incelendiğinde, beyaz peynirde baskın tür olarak *Lactococcus lactis* ve *Streptococcus thermophilus*'un bulunduğu görülmektedir. Bu mikroorganizmalar özellikle peynirin olgunlaşmasının ilk aşamalarında daha belirgindir. Beyaz peynirde önemli tür olarak bildirilen diğer mikroorganizmalar *Enterococcus faecalis* ve *E. faecium*'dur. *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp *dextranicum* ve *Leu. lactis* türleri de beyaz peynirde ağırlıklı olarak bulunan bakterilerdir. Ülkemizde beyaz peynir starter kültürü ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde özellikle *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ve *Lc. lactis* subsp. *lactis*'in, bunların yanında *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *St. thermophilus*, *L. helveticus* ve *L. plantarum* bakterilerinin beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Çizelge 2).

Laktik Asit Bakterileri

Laktik asit bakterileri, gıda endüstrisinde birçok fermente gıda ürününün üretiminde kullanılan önemli bakterilerdir. Laktik asit bakterileri, filogenetik olarak Lactobacillales takımına ait, 6 aile, 30'dan fazla cins ve 300'den fazla türü barındıran bir bakteri grubudur (Endo vd., 2019). *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinsleri başlıca laktik asit bakterileridir. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırması Çizelge 3'te verilmiştir (KEGG, 2020). Zheng vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, laktik asit bakterilerinden Lactobacillaceae ve Leuconostocaceae ailelerinin

sınıflandırılması tüm genom dizileme teknikleriyle yeniden değerlendirilmiştir. Çalışmanın çıktısı olarak *Lactobacillus* cinsinin 25 cinse ayrılması önerilmiştir. Bunlar daha önceden de var olan fakat çalışmada tanımı tekrar yapılan *Lactobacillus* ve *Paralactobacillus* cinsleri ile 23 yeni cins; *Levilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Secundilactobacillus*, *Holzapfelia*,

Loigolactobacillus, *Dellaqlia*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Pancilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Liquorilactobacillus* ve *Schleiferilactobacillus* olmuştur. Tanımlanan bu yeni cinslerin temsil ettiği eski *Lactobacillus* cinsi bakterilerin sadece cins isimleri değişmiş olup tür ve suş isimleri aynı kalmıştır.

Çizelge 2. Beyaz peynir starter kültürü olarak kullanılabileceği bildirilen mikroorganizmalar (Cerit, 2020)

Starter kültür	Kaynak
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Uysal, 1996
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Gürsoy vd., 2001
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. helveticus</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Dağdemir, 2001
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Hayaloğlu vd., 2002
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Tunail, 2009
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
Mezofilik kültür+ <i>E. faecium</i> EF031 (ek kültür)	Bulat, 2011
Mezofilik kültür+ <i>E. faecium</i> M74 (ek kültür)	
<i>L. lactis</i>	Ertürkmen vd., 2015
<i>E. faecium</i>	
<i>L. plantarum</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis/ cremoris</i>	Chr. Hansen, 2014
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
<i>St. thermophilus</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kesenkaş, 2015
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Danisco, 2019
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>St. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Natural Food Culture, 2019
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>St. thermophilus</i>	

Laktik asit bakterileri Gram pozitif, *Sporlactobacillus inulinus* dışında spor oluşturmayan, anaerobik, aerobik ya da fakültatif aerobik olan, kok ya da çubuk şekilli, karbonhidrat metabolizmasının ana fermentasyon ürünlerinden biri olan laktik asiti üreten oldukça değerli mikroorganizmalardır (Tunail, 2009). Bu

bakteriler aynı zamanda, asidi tolere edebilen, katalaz ve oksidaz negatif olan, nitrati redükte edemeyen mikroorganizmalardır. Laktik asit bakterileri düşük guanin ve sitozin (G+C) oranına (%35-53) sahiptirler ve genom büyüklükleri genel olarak 1.8-3.4 Mbp arasında değişmektedir (Yılmaz vd., 2015).

Çizelge 3. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Enterococcus* cinsi laktik asit bakterilerinin taksonomik sınıflandırması

	<i>Lactococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>
Alem	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Şube	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes	Firmicutes
Sınıf	Bacilli	Bacilli	Bacilli	Bacilli
Takım	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales	Lactobacillales
Aile	Streptococcaceae	Streptococcaceae	Lactobacillaceae	Enterococcaceae
Cins	Lactococcus	Streptococcus	Lactobacillus	Enterococcus

Laktik asit bakterileri gelişmek için karbonhidratlar, amino asitler, vitamin, mineral ve bazen de yağ asitleri ve peptitler gibi zengin besinlere ihtiyaç duymaktadırlar. Bundan dolayı da besin içeriği yüksek olan ortamlarda bulunurlar. Bunlara, gastrointestinal sistem; mide ve bağırsak, vajinal yollar, ağız boşluğu, bitki yüzeyleri, silaj ve süt ve süt ürünleri gibi çok çeşitli ortamlar örnek olarak verilebilmektedir (Endo vd., 2019). Laktik asit bakterileri buldukları ortamın içeriğindeki hegzosları fermente ederek laktik asit oluştururlar ve fermentasyon sonucu ürettikleri son ürüne göre iki gruba ayrılırlar. Hegzoslardan sadece laktik asit (%90-100) oluşturanlar homofermantatif laktik asit bakterileri, laktik asidin (%50) yanısıra etanol, asetat ve CO₂ oluşturanlar ise heterofermantatif laktik asit bakterileridir.

Laktik asit fermentasyonu sonucu ortaya çıkan laktik asit, asetik asit, asetaldehit ve diasetil gibi aromatik bileşikler sayesinde yoğurt, peynir çeşitleri, kefir, ekşi krema, fermente çiğ sucuk, tarhana gibi kendine özgü tadı ve aroması olan ürünler elde edilmektedir. Bundan dolayı seçilen bazı laktik asit bakterisi suşlarından starter kültürler, aroma geliştirici kültürler ve probiyotik kültürler üretilmektedir. Starter kültür özelliği gösteren laktik asit bakterilerinin ürettiği laktik asit ile ortamın asitliği artar ve asidi tolere edemeyen mikroorganizmaların bu ortamda yaşaması güçleşir. Laktik asit bakterileri asidi tolere edebildikleri için bu ortamda rekabetçi konumdadır ve böylelikle patojen ve diğer mikroorganizmaların inhibe edilmesini sağlarlar.

Bunun yanında laktik asit bakterilerinin metabolitlerinden olan hidrojen peroksit, diasetil, bakteriyosin ve amonyak gibi maddeler diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Böylece bir gıda maddesinde laktik asit bakterilerinin varlığı ile istenmeyen mikroorganizmaların inhibe edilmesi sağlanabilmektedir. Laktik asit bakterileri gıda endüstrisinde önemli bir yeri olan fermente gıdaların üretilmesinde starter kültür olarak kullanılmaları, asitlik ve aroma geliştirici olmaları, antimikrobiyal aktiviteleri ve probiyotik olmaları gibi özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde çok önemli bir yer tutmaktadırlar.

Laktik Asit Bakterilerini Tanımlama Yöntemleri

Laktik asit bakterilerinin tanımlanması süt endüstrisi için büyük önem arz etmektedir. Laktik asit bakterilerinin tanımlanması ile süt ve süt ürünlerinin mikrobiyotası hakkında edinilen bilgiler starter kültür ve peynir üretim teknolojilerinin geliştirilmesinde kullanılarak süt endüstrisine ekonomik anlamda katkı sağlayabilmektedir. Ayrıca süt ve ürünlerinin mikrobiyotasının belirlenmesi, süt ürünlerinin kalitatif ve duyusal özelliklerinin ve güvenilirliğinin kontrol edilmesi için oldukça önemlidir (Tilocca vd., 2019).

100 yılı aşkın süredir mikrobiyolojide, mikroorganizmaların katı besiyeri kullanılarak izole edilmesi ve uygulanan bazı testlerle bu izolatların morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin belirlenmesiyle tanımlanması

esasına dayalı klasik kültürel yöntemler kullanılmaktadır. Mikroorganizmalar ile ilgili çalışmalar, 1676 yılında Leeuwenhoek'un ağız mikroorganizmalarıyla ilgili raporundan günümüzde kullanılan moleküler yöntemler ile tanımlama çalışmalarına kadar uzun bir yol kat etmiştir. Mikroorganizmaların izolasyonu ile ilgili çalışmalar ilk olarak bilim insanlarının patates dilimleri ve jelatin gibi katı besi ortamlarında mikroorganizmaları kültüre etmeleriyle başlamıştır. İzolasyon yöntemlerinin bulunması mikroorganizmaların “Görünmeyen organizmalar” olarak adlandırıldığı dönemlerde mikroorganizmaların keşfi, mikroskop altında gözlemlenebilmesi ve onların fizyolojilerinin anlaşılabilmesi adına ilk basamak olmuştur (Escobar- Zepeda vd., 2015).

1970'lerin sonunda ribozomal RNA (rRNA) genlerinin moleküler markırlar olarak kullanılabilmesi görüşünün ortaya atılması ve bununla birlikte Sanger sekanslamasının ortaya çıkışı mikroorganizmaların tanımlanmasında bir devrim yaratmıştır (Escobar- Zepeda vd., 2015). Ardından Polimeraz zincir reaksiyonu, rRNA genlerinin klonlanması ve dizilenmesi, Denature edici Gradient Jel Elektrofrezisi (DGGE) gibi moleküler yöntemler mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır (Ercolini, 2013; Yılmaz vd., 2015). Metagenomik analizlerin ortaya çıkması, mikroorganizmaların tanımlanmasında önemli bir adım olmuştur. Saf kültürlerin izolasyonuna dayalı tanımlama tekniklerinin aksine metagenomik analizler kültüre edilemeyen mikroorganizmaların da tanımlanabilmesine olanak sağlamaktadır (Zhang vd., 2019).

Laktik Asit Bakterilerinin Klasik Kültürel Yöntemlerle Tanımlanması

Klasik kültürel yöntemlerle tanımlamada ilk aşama mikroorganizmaların saf kültür halinde izole edilmeleridir. Bunun için uygun seçici besiyerlerinden yararlanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin geliştirilmesi ve izolasyonunda MRS Agar ve MRS Broth, M17 Agar ve M17 Broth, Kanamycin Esculin Azide Agar gibi yüksek besleyici özelliğe sahip seçici besiyerleri kullanılmaktadır. Laktik asit bakterilerinin

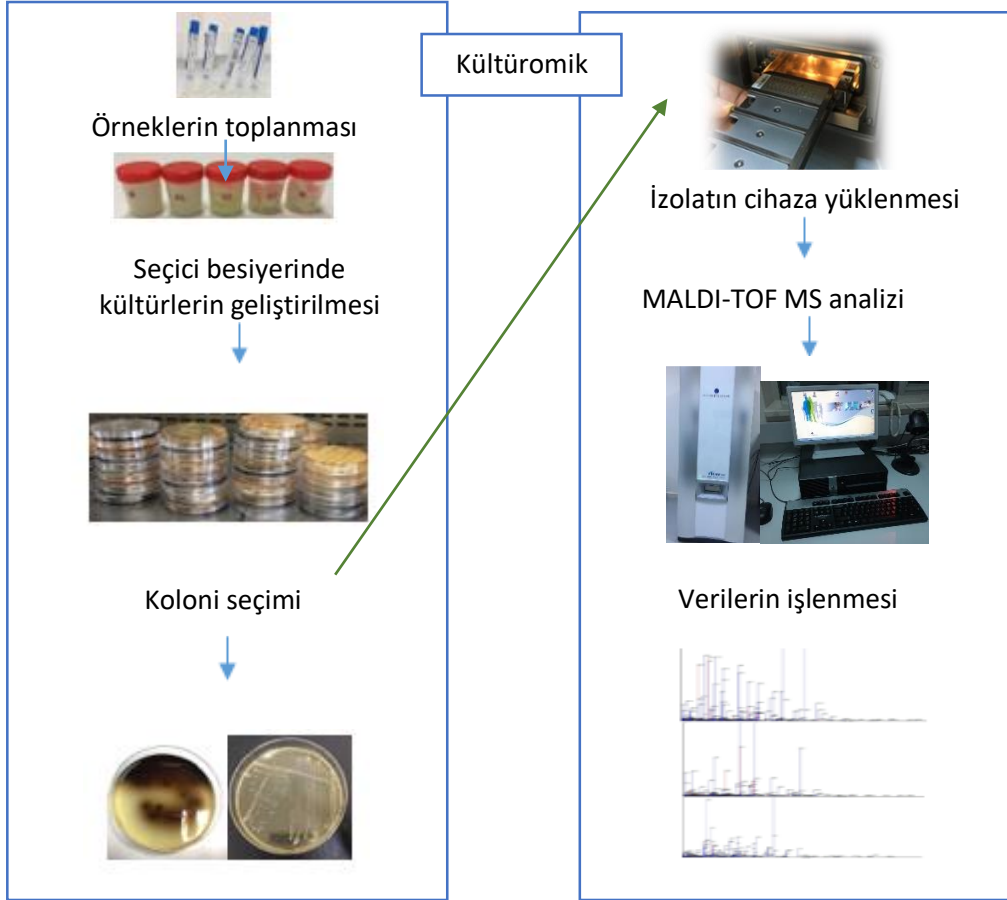
tanımlanmasında ilk olarak seçici besiyerinden uygun makroskopik morfolojiye sahip koloniler seçilerek saf kültür olarak elde edilir. Ardından izolatların mikroskopik morfolojileri incelenerek kaydedilir. Sonrasında izolatların Gram reaksiyonu ve katalaz aktiviteleri belirlenmektedir. Sporsuz çubuk veya kok şeklinde, Gram pozitif ve Katalaz negatif özellik gösteren izolatlar laktik asit bakterileri olarak belirlenmektedir. Klasik kültürel yöntemlerde bakterilerin cins düzeyinde tanımlanması amacıyla bir takım biyokimyasal ve fizyolojik testler uygulanmaktadır. Bunlara; farklı sıcaklık ve pH değerleri ile farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme, glukozdan gaz oluşturma, karbonhidrat fermentasyon testleri, antibiyotik duyarlılığı, arjininden amonyak üretimi, indol, Voges-Proskauer, jelatin hidrolizi ve üreaz testleri, sukrozdan dekstran oluşturma gibi testler örnek gösterilebilir.

Kültüromik yaklaşımı ile Laktik Asit Bakterilerinin İzolasyonu ve Tanımlanması

Kültüromik, seçici besiyerlerinde farklı ortam şartlarında geliştirilen ve saf kültür olarak elde edilen izolatların Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon- Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) ile tanımlanmasına olanak sağlayan bir yaklaşımdır (Garcia vd., 2016; Nacef vd., 2017). Şekil 3'te kültüromik yaklaşımı özetlenmiştir. MALDI-TOF MS, mikroorganizmaların proteinlerinin iyonize edilerek bir elektrik alandan geçirilmesi ile protein profillerinin çıkarılması esasına dayanır (Santos vd., 2016). MALDI-TOF MS'te tanımlamanın ilk basamağı saf kültür olarak elde edilen izolatın hedef plaka üzerinde matris solüsyonu ile muamele edilip kristalleştirilmesidir (Harnpicharnchai vd., 2020). Matris solüsyonu ile kaplanan ve kuruması beklenen örnek sonrasında hedef plaka ile cihaza yüklenir. Cihaz içi vakumu sağlandıktan sonra hedef plaka lazer ışınına maruz bırakılır. Kristalle halde bulunan proteinler lazer ışınının etkisiyle iyonlaşır ve protonlanmış iyonlar elde edilir. İyon bulutu bir elektrik alanda hızlandırılarak uçuş tüpünden geçirilir. İyonların uçuş tüpünde geçtikleri süre (Time of Flight, TOF) uçuş süresi analizatörleri ile

hesaplanır. Bu süre iyonların kütleyle ilişkilidir. İyonların uçuş tüpünde aldıkları yol tamamlandığında, her bir izolat için kütle spektrumları elde edilir. Bu spektrumlar veri

tabanında bulunan veriler ile karşılaştırılır ve mikroorganizmaların tanımlanması gerçekleştirilir (Lagier vd., 2018).



Şekil 3. Kültüromik yaklaşımının şematik gösterimi (Orijinal resimler kullanılmıştır).

Kültüromik yaklaşımının, mikrobiyel toplulukta az yoğunlukta bulunan mikroorganizmaların da tanımlanması, hızlı ve ekonomik olması, yalnızca canlı mikroorganizmaların tanımlanmasına olanak sağlaması ve tanımlanan kültürlerin ileri çalışmalar için saklanmasına izin vermesi gibi avantajları vardır. Ancak kültüromik yöntemi ile sadece kültüre edilebilen mikroorganizmaların tanımlanması mümkün olmaktadır (Nacef vd., 2017).

Metagenomik Analizler

Mikrobiyel topluluk bir ortamda aynı anda birlikte var olan organizmalar grubudur.

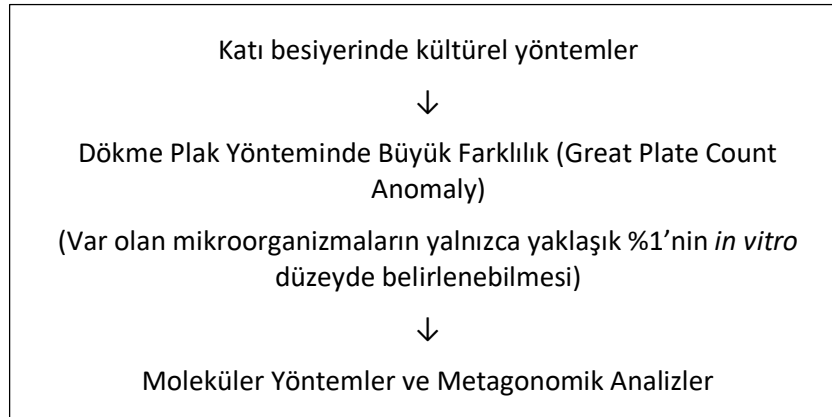
Mikroorganizmaların fizyolojilerini anlamak için kullanılan yöntemlerin, Robert Koch'un katı halde besin öğelerini mikroorganizmaların sayısını belirlemek ve onları mikroskop altında görüntülemek için kullanmasıyla başladığı ifade edilebilir. Ancak, Petri kabında gelişen ve mikroskopta görüntülenen mikroorganizma sayısı arasındaki büyük fark, mikroorganizmaları kültüre etme yöntemlerinin yetersiz kaldığını göstermiştir (Handelsman, 2004; Sielaff vd., 2019). Dökme Plak Yönteminde Büyük Farklılık (Great Plate Count Anomaly) olarak isimlendirilen bu yetersizlik, var olan mikroorganizmaların yaklaşık olarak yalnızca %1'nin *in vitro* olarak

belirlenebildiğini göstermiştir (Escobar-Zepeda vd., 2015; Serra vd., 2019). Elde edilen bu veriyle beraber belli bir ortamda bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi ve tanımlama çalışmalarının yapılabilmesi için yeni yöntemlerin gerekliliği ortaya çıkmıştır (Şekil 4).

Metagenomik, çevresel bir örnekte bulunan tüm genomların doğrudan izole edilerek genetik analizinin yapılması olarak tanımlanabilir (Chiu vd., 2019). Genetik materyalin dizilenmesiyle gerçekleştirilen metagenomik analizler yeni nesil dizileme yöntemleriyle gerçekleştirilir. Yeni nesil dizileme sistemleriyle bitki, bakteri, maya, küf, virüs gibi mikroorganizmaların genomlarının ultra hızlı olarak, yüksek doğrulukla dizilenmesi mümkündür. Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme sistemleri, Illumina Genome Analyzer, Applied BioSystem SOLID, Complete

Genomics, Helios, Pacific Biosciences ve IonTorrent'tir (Jongman vd., 2020; Nair ve Bhat, 2020).

Metagenomik analizler amplicon dizileme ve shotgun olarak ikiye ayrılmaktadır. Amplicon dizilemede, örnekten tüm mikroorganizmaların toplam DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra taksonomik bilgi veren belirli gen bölgeleri hedeflenir. Bunlara, nesiller boyu korunmuş ve taksonomik bilgi veren *16S rRNA*, *18S rRNA* ve *ITS* genleri örnek verilebilir (Parente vd., 2020). Bu hedeflenen genler spesifik primerler yardımıyla PCR ile amplifiye edilirler. Amplifiye edilen gen bölgeleri dizilenir ve biyoinformatik araçlarla bu diziler anlamlı verilere dönüştürülerek mikroorganizmalar tanımlanmış olur (Ranjan, 2016; Breitwieser vd., 2019; Serra vd., 2019).



Şekil 4. Metagenomik analizlerin ortaya çıkışı

Shotgun dizileme ise; örnekte bulunan tüm genomun rastgele parçalarının dizilendiği sistemdir. Shotgun dizileme ve amplicon dizilemenin en önemli farkı tüm genom shotgun dizileme ile mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanmasında amplicon dizilemeyle tanımlamaya kıyasla daha güvenilir sonuçlar elde edilmesidir (Ranjan, 2016; Thoendel vd., 2019). Tüm genom shotgun dizileme ve amplicon dizilemede farklı veri tabanları kullanılmaktadır ve shotgun dizilemede daha büyük ham veri elde edilmektedir (Deurenberg vd., 2017; Escobar-Zepeda vd., 2018; Jagadeesan vd., 2019).

Tüm genom shotgun dizileme daha ayrıntılı incelenecek olursa, ilk aşama yine ortamda bulunan mikroorganizmaların genetik materyalinin doğrudan ekstrakte edilmesidir. Bu elde edilen genetik materyal o ortamda bulunan tüm mikroorganizmaların genomunu kapsamaktadır (Zhou vd., 2019). Toplam genom olarak doğrudan izole edilen DNA'lar dizileme için çok uzundur. Bu yüzden öncelikle DNA'ların küçük fragmentlere (200-600 bp) mekanik ya da enzimatik yollarla ayrılması gerekir. Küçük parçalara ayrılan DNA fragmentlerinin iki ucuna adaptörler eklenir. Bu adaptörler kütüphanenin oluşturulması sırasında DNA fragmentlerinin bir

yüzeyle bağlanması için gereklidir. Daha sonra bu DNA fragmentleri 95°C'ye ısıtılarak denatüre edilir ve tek zincirli hale getirilir. Tek zincirli hale getirilen DNA fragmentlerinin bir yüzeyle tutunması sağlanır. Bu yüzeyle kullanılan yeni nesil sekanslama tekniğine göre değişim göstermektedir (Kader vd. 2016, Jagadeesan vd., 2019). Illumina sistemde bu amaç için oligonükleotitlerle kaplanmış bir akış hücresi kullanılırken, Ion Torrentte boncuklar (bead) kullanılır. Yüzeyle tutunan DNA parçaları kütüphaneleri oluşturur. Devamında bu kütüphanelerden kümeler oluşturulur. Bu amaçla ortama eklenmiş olan nükleotitler, polimeraz enzimi, primerler ve buffer ile DNA'ların eşlenmesi gerçekleşir. Çift zincirli hale gelen DNA'lar tekrar denatüre edilir ve orijinal zincir uzaklaştırılır. Sonra kalan zincirler tekrar eşlenirler bu döngü defalarca tekrarlanır ve bu şekilde kümeler oluşturulmuş olur. Dizileme aşamasına geçildiğinde DNA'ların eşlenmesinde floresanla modifiye edilmiş nükleotitler kullanılır (Ranjan, 2016; Zhang vd., 2019). Böylece her bir nükleotitin eklenmesinde ışık kaynağı ile birlikte hangi nükleotitin eklendiği görüntülenir ve böylece sırayla eklenen nükleotitler dizilenmiş olur. Dizileme işleminden sonra elde edilen verilerin dizi analizi biyoinformatik araçlar yardımıyla gerçekleştirilir. Bu analizlerle hedeflenen ortamda hangi mikroorganizmaları olduğu ve bunların ne oranda bulunduğu tespit edilebilir (Jagadeesan vd., 2019; Weiss vd., 2019).

Gıdalar bakterisi, maya, küf gibi organizmaları birlikte bulundurur ve bu mikroorganizmalar birbirleriyle etkileşimde bulunarak gıdaların fermantasyonundan sorumludur veya bozulmasına sebep olur. Son yirmi yılda geliştirilen kültürden bağımsız metotlar ile gıda üretimi, depolaması ve dağıtım süreçleri fermantasyon ve bozulma dinamikleri incelenmiştir (Cocolin ve Ercolini 2015; Serra vd., 2019). Gıdalarda gerçekleştirilen bu çalışmaların; gıda patojenlerinin tayini, gıdalarda bozulmalara yol açan mikroorganizmaların tayini, fermantasyon süresince mikroorganizma değişiminin izlenmesi, potansiyel starter ya da yararlı mikroorganizmaların belirlenmesi gibi çıktıları olmaktadır.

Ülkemizde beyaz peynirin mikrobiyel kompozisyonunun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde genellikle klasik kültürel yöntemler ve biyokimyasal testlerin kullanıldığı, bunun yanında son zamanlarda 16S rRNA dizileme yönteminin öne çıktığı görülmektedir (Hayaloğlu vd., 2002; Ertürkmen vd., 2015; Arslan, 2017).

Arslan (2017) yaptığı çalışmada, Erzurum başta olmak üzere Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladığı beyaz peynirlerden laktik asit bakterilerinin izolasyonunu ve *API, 16S rRNA* gen analizi ve rep-PCR yöntemleri ile identifikasyonunu gerçekleştirmiştir. Buna göre *Lactobacillus kefirii*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *Pediococcus lolii*, *Prolinoborus fasciculus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Lysinibacillus sordarius*, *P. parvulus*, *L. paraplantarum*, *Staphylococcus hominis*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus yunnanensis*, *Microbacterium paraoxydans* ve *Rothia dentocariosa* türlerine ait 42 adet izolat tanımlanmıştır.

Dec vd. (2016) tarafından kümes hayvanlarından izole edilen *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin tanımlanması amacıyla yapılan çalışmada 16S-ARDRA ve MALDI-TOF yöntemleri kullanılmış ve sonuçta; *L. salivarius*, *L. johnsonii* ve *L. ingluviei* türleri baskın mikroorganizmalar olarak kaydedilmiştir. Ayrıca MALDI-TOF MS'in diğer yöntemlere kıyasla çok daha hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Literatür incelendiğinde, çeşitli fermante gıda ürünlerinin mikrobiyotasının belirlenmesi ve fermantasyon sürecinde rolü olan mikroorganizmaların aydınlatılabilmesi amacıyla yüksek çıktılı yeni nesil dizileme yöntemleriyle çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Bu gıda ürünleri; kefir (Nalbantoğlu vd., 2014; Garofalo vd., 2015; Walsh vd., 2016; Verce vd., 2020), pirinç şarabı (Bora vd., 2016), tahıl sirkesi (Wu vd., 2017), üzüm ve şarap (Sternes vd., 2017; Wei vd., 2018; Cerutti vd., 2019), kakao taneleri (Agyirifo, 2019; Serra vd., 2019), kahve (Pothakos vd., 2020), çiğ süt (Kable vd., 2016; Doyle vd., 2017), sucuk (Ferrocino vd., 2018) ve peynirdir (Wolfe vd., 2014; Dalmasso vd., 2016; Dugat-

Bony vd., 2016; Guidone vd., 2016; Escobar-Zepeda vd., 2016; Domingos-Lopes vd., 2017; Duru vd., 2018; Savaşan ve Beyaz, 2019).

Wolfe vd. (2014) yaptığı çalışmada eskitilmiş peynirin kabuk kısmının mikrobiyel çeşitliliğinin belirlenebilmesi, mikroorganizmaların metabolizmalarının ve fonksiyonlarının araştırılabilmesi ve bu peynirin kabuk kısmını oluşturan mikroorganizmalara ait bir model oluşturulabilmesi amacıyla, Avrupa'dan Amerika'ya 10 farklı ülkede starter kültür kullanılarak üretilen ve olgunlaştırılan 137 adet eskitilmiş peynirin kabuk kısmında PCR bazlı ampikon dizileme yapılmıştır. Bakteri komuniteleri için *16S rRNA* ve küf komuniteleri için *ITS* bölgeleri dizilenmiştir. Çalışmanın sonucunda tüm örneklerde %1'den fazla bulunan ve bu oranla baskın mikroorganizma olan 14 adet bakteri ve 10 adet küf cinsi tespit edilmiştir. Tespit edilen cins sayısının sınırlı olmasının, bu mikroorganizmaların starter kültür kaynaklı olmasından ötürü olduğu bildirilmiştir. Ancak bunun yanında bakterilerin %60'ının küflerin ise %25'lik kısmının starter kültür olmayan mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir. Starter kültür kaynaklı olmayan bu mikroorganizmaların çevresel kaynaklardan gelmiş olabileceği bildirilmiştir. Çevresel kaynaklardan gelen bu mikroorganizmaların peynirlerin yapı, tat, koku gibi özelliklerinin oluşmasında katkısının olabileceği bildirilmiştir.

Guidone vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada, farklı asidifikasyon yöntemleri ile üretilen yüksek nemli Mozzarella peynirlerinden alınan örneklerin mikrobiyel kompozisyonu yüksek çıktılı yöntemlerle incelenmiştir. Örneklerden yapılan DNA ekstraksiyon işleminin ardından *16S rRNA* genlerinin V1-V3 bölgeleri amplifiye edilmiş ve pirosekanslama yöntemi ile dizilenmiştir. Kalite kontrol ve filtreleme işlemleri QIIME 1.8.0 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, starter kültür kullanılan peynirlerde *Streptococcus thermophilus* baskın tür olarak gözlenmiştir. Bunun yanında diğer laktik asit bakterileri ve %0,01-1 oranında bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar gözlenmiştir. Sitrik asit kullanılan 5 örnek ve etiket bilgisi olmayan 5

örnekte ise laktik asit bakterileri, psikotrofik mikroorganizmalar ve Enterobacteriaceae ailesine ait mikroorganizmalardan oluşan yüksek mikrobiyel çeşitlilik gözlenmiştir. Sonuç olarak sitrik asit kullanılan ve etiket bilgisi içermeyen peynirlerin mikrobiyel çeşitliliğinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu yöntemle starter kültürlerle üretilen Mozzarella peynirlerinin diğer yöntemlerle üretilen peynirlerden mikrobiyel açıdan farklılığı kanıtlanmış ve peynir endüstrisinde yapılan hilelerin anlaşılabilceği belirtilmiştir.

Verce vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, kefir mikrobiyotasının belirlenmesi amacıyla shotgun dizileme yapılmış ve yeni bir bakteri türü keşfedilmiştir. Bunun için fermantasyonun 2 farklı aşamasında hem kefir tanelerinden hem de kefirin sulu kısmından olmak üzere 4 örnek alınmıştır. Örneklerden DNA ekstraksiyonu yapılmış, shotgun dizileme Ion PGM cihazında gerçekleştirilmiş ve elde edilen diziler BLAST, Kraken ve Kaiju gibi biyoinformatik araçlar kullanılarak anlamlandırılmıştır. Çalışma sonunda kefirde *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus paracasei* ve çeşitli *Lactobacillus* türleri bulunmuştur. Bunun yanında *Bifidobacterium aquikefiri* ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Dekkera bruxellensis* mayaları da tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada Shothun metagenomik dizileme ile *Oenococcus oeni* ve *Oenococcus kitaharae* türleri ile ilişkili yeni bir *Oenococcus* türü tespit edildiği ve bu türün *Candidatus Oenococcus aquikefiri* olarak isimlendirildiği raporlanmıştır.

SONUÇ

Son yıllarda mikroorganizmaların tanımlanmasında klasik kültürel yöntemlerin yanı sıra genetik materyale dayalı moleküler tekniklerin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Kültüre dayalı moleküler yöntemlerin yanında kültürden bağımsız metagenomik teknolojisi çevresel örneğin taşıdığı mikrobiyel yükün toplam genomunun dizilenmesine olanak sağlaması ile mikroorganizmaların tanımlanmasına ve mikrobiyota çalışmalarına yeni bir bakış açısı getirmiştir. Bu nedenle, endüstriyel olarak üretilen beyaz peynir mikrobiyotasının belirlenmesinde

MALDI-TOF MS temelli kültüromik yaklaşımı ve shotgun dizileme temelli metagenomik teknolojilerin birlikte kullanılması önemli görülmektedir. Bunun yanında beyaz peynir işletmesinde üretim süresince peynire doğrudan ve/veya dolaylı yoldan temas eden ekipman mikrobiyotasının belirlenmesi ve bunun beyaz peynir mikrobiyotasına katkısının aydınlatılması endüstriyel açıdan önem arz etmektedir. Ayrıca, amacı geleneksel gıda ürünlerinin mikrobiyal çeşitliliğini keşfetmek ve bu çeşitliliğin insan sağlığı açısından önemini ortaya koyacak ileri çalışmalar için yenilikçi yöntemlerin değerlendirilmesi gereklidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TAGEM ve MAYSA GIDA tarafından TAGEM/18/AR-GE/31 nolu sayılı proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TAGEM Kurumuna ve MAYSA GIDA'ya teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Bu çalışmada tüm yazarların katkısı eşittir.

KAYNAKLAR

Agyirifo, D.S., Wamalwa, M., Otwe, E.P., Galyuon, I., Runo, S., Takrama, J., Ngeranwa, J. (2019). Metagenomics analysis of cocoa bean fermentation microbiome identifying species diversity and putative functional capabilities, *Heliyon* 5(7): e02170, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02170.

Anonymous (2009). Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (2009/68). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 8 Ocak 2010 tarih ve 27456 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2015). Türk Gıda Kodeksi. Peynir Tebliği (2015/6). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. 8 Şubat 2015 tarih ve 29261 sayılı Resmi Gazete, Ankara.

Anonymous (2020) Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü (TEPGE) 2017-

2018 Süt ve Süt Ürünleri Durum Tahmin Raporu. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Durum-Tahmin%20Raporlar%C4%B1/2017-2018%20Durum-%20Tahmin%20Raporlar%C4%B1/S%C3%BCt%20Durum%20Tahmin%20Raporu%202017-2018-305.pdf> (Erişim tarihi: 15 Mart 2020).

Anonymous (2020). Ulusal Süt Konseyi 2018 Süt Raporu. https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wp-content/uploads/Sut_Raporu_2018_Web_Kapakli.pdf (Erişim tarihi: 15 Mart 2020).

Arslan, S. (2017). Türkiye'nin farklı yörelerinden toplanan beyaz peynir örneklerinden laktik asit bakterilerinin izolasyonu, identifikasyonu ve moleküler karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, Türkiye, 116 s.

Bora, S.S., Keot, J., Das, S. Sarma, K., Barooah, M. (2016). Metagenomics analysis of microbial communities associated with a traditional rice wine starter culture (*Xaj-pitha*) of Assam, India. *3 Biotech*, 6(2): 153, doi: 10.1007/s13205-016-0471-1.

Breitwieser, F. P., Lu, J., Salzberg, S. L. (2019). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Brief Bioinform*, 20(4): 1125-1136, doi: 10.1093/bib/bbx120.

Cerit, Z.G. (2020). Beyaz peynir ve süt işleme tesisinden izole edilen mikrobiyotanın karakterizasyonu. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Türkiye 165 s.

Cerutti, F., Cravero, D., Costantini, A., Pulcini, L., Modesto, P., Acutis, P.L., Vaudano, E., Peletto, S. (2019). Impact of DNA purification method and primer selection on 16S rRNA gene metabarcoding on wine. *OENO One*, 53 (3). doi: 10.20870/oenone.2019.53.3.2368.

Cocolin, L., Ercolini, D. (2015). Zooming into food-associated microbial consortia: a 'cultural' evolution. *Curr Opin Food Sci*, 2: 43-50, doi: 10.1016/j.cofs.2015.01.003.

- Dalmasso, A., Río, M.D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., Bottero, M.T. (2016). Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *Lebensm Wiss Technol*, 69: 490-496, doi: 10.1016/j.lwt.2016.02.004.
- Dec, M., Puchalski, A., Urban-Chmiel, R., Wernicki, A. (2016). 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiol*, 16 (105), doi: 10.1186/s12866-016-0732-5
- Deurenberg, R.H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M.A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A.M., Raangs, E.C., Rosema, S., Veloo, A.C., Zhou, K., Friedrich, A.W., Rossen, J.W. (2017). Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol*, 243: 16-24, doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.022.
- Domingos-Lopesa, 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. *Food Microbiol*, 63:178-190, doi: 10.1016/j.fm.2016.11.014.
- Doyle, C.J., Gleeson, D.E., O'Toole, P.W., Cotter, P.D. (2017). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Appl Environ Microbiol*, 83: 2, doi: 10.1128/AEM.02694-16.
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A., Bonnarme, P., Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int J Food Microbiol*, 238: 265-273, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026.
- Duru, I.C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., Smolander, O.P. (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *Int J Food Microbiol*, 281: 10-22 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017.
- Ercolini, D., Mauriello, G., Blaiotta, G., Moschetti, G., Coppola, S. (2004). PCR-DGGE Fingerprints Of Microbial Succession During A Manufacture Of Traditional Water Buffalo Mozzarella Cheese. *J Appl Microbiol*, 96(2): 263-70, doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02146.x.
- Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing And Metagenomics: Moving Forward In The Culture-Independent Analysis Of Food Microbial Ecology. *Appl Environ Microbiol*, 79 3148–3155, doi: 10.1128/AEM.00256-13.
- Ertürkmen, P., Öner, Z. (2015) "Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Başlatıcı (Starter) Kültür Özelliklerinin Biyokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi". Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 19: 9-16, doi: 10.19113/sdufbed.25545.
- Escobar-Zepeda, A., Vera-Ponce De León, A., Sanchez-Flores, A. (2015). The Road to Metagenomics: From Microbiology to DNA Sequencing Technologies and Bioinformatics. *Front Genet*, 6 (348), doi: 10.3389/fgene.2015.00348.
- Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., Barucha, M. Q. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol*, 57: 116-127, doi: 10.1016/j.fm.2016.02.004.
- Escobar-Zepeda, A., Godoy-Lozano, E.E., Raggi, L. (2018). Analysis of sequencing strategies and tools for taxonomic annotation: Defining standards for progressive metagenomics. *Sci Rep*, 8, doi: 10.1038/s41598-018-30515-5.
- Ferrocino, I., Bellio, A., Giordano, M., Macori, G., Romano, A., Rantsiou, K., Decastelli, L., Cocolin, L. (2018). Shotgun Metagenomics and Volatilome Profile of the Microbiota of Fermented Sausages. *Appl Environ Microbiol*, 84(3): e02120-17. doi: 10.1128/AEM.02120-17.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., Filippis, F.D., Stellato, G., Mauro, S.D., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementi, F. (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian

- regions. *Food Microbiol*, 49: 123-133, doi: 10.1016/j.fm.2015.01.017.
- Guidone A., Zotta, T., Matera, A., Ricciardi, A., Filippis, F.D., Ercolini, D., Parente, E. (2016). The microbiota of high-moisture mozzarella cheese produced with different acidification methods. *Int J Food Microbiol*, 216: 9–17, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.002.
- Handelsman, J. (2004). Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(4): 669-685, doi: 10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004.
- Harnpicharnchai, P., Jaresitthikunchai, J., Seesang, M., Jindamorakot, S., Tanapongpipat, S., Ingsriswang, S. (2020). Characterization of Yeast and Bacterial Type Strains with Food and Agricultural Applications by MALDI-TOF Mass Spectrometry Biotypin. *Hanguk Misaengmul Saengmyong Konghakhoe Chi*, 48(2): 138-147. doi: 10.4014/mbl.1910.10008.
- Hayaloğlu, A.A., Güven, M., P. F. Fox. (2002). Microbiological, Biochemical and Technological Properties Of Turkish White Cheese 'Beyaz Peynir'. *Int Dairy J*, 12(8): 635-648. doi: 10.4172/2572-4134.1000117.
- Jagadeesan, B., Gerner-Smidt, P., Allard, M.W., Leuillet, S., Winkler, A., Xiao, Y., Chaffron, S., Vossen, J.V., Tang, S., Katase, M., McClure, P., Kimura, B., Chai, L.C., Chapman, J., Grant, K. (2019). The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food microbiol*, 79: 96-115, doi: 10.1016/j.fm.2018.11.005.
- Jonnala, B.R.Y., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J., Cotter, P.D. (2018). Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Front Microbiol*, 23(9): 1020, doi: 10.3389/fmicb.2018.01020.
- Jongman, M., Carmichael, P.C., Bill, M. (2020). Technological Advances in Phytopathogen Detection and Metagenome Profiling Techniques, *Curr Microbiol*, 77: 675–681, doi: 10.1007/s00284-020-01881-z.
- Kable, M.E., Srisengfa, Y., Laird, M., Zaragoza, J.L., Mcleod, J., Heidenreich, J.M., Marco, M.L. (2016). The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to a Milk Processing Facility. *mBio*, 7, doi: 10.1128/mBio.00836-16.
- Kader, T., Goode, D. L., Wong, S. Q., Connaughton, J., Rowley, S. M., Devereux, L., Byrne, D., B. F., Stephen, Arnau, G. M., Tothill, R. W., Campbell I. G., Gorringer, K. L. (2016). Copy number analysis by low coverage whole genome sequencing using ultra low-input DNA from formalin-fixed paraffin embedded tumor tissue, *Genome Med*, 8(121), doi: 10.1186/s13073-016-0375-z.
- KEGG GENOME Database (2020). Organisms and ecosystems with genome sequence information. <https://www.genome.jp/kegg/genome.html> (Erişim tarihi: 20 Şubat 2020).
- Knight R., Vrbanc, A., Taylor, B. C., Aksenov, A., Callewaert, C., Debelius, J., Gonzalez, A., Kosciolk, T., McCall, L. I., McDonald, D., Melnik, A. V., Morton, J. T., Navas, J., Quinn, R.A., Sanders, J. G., Swafford, A. D., Thompson, L. R., Tripathi, Xu, Z. Z., Zaneveld, J. R., Zhu, Q., Caporaso J. G., Dorrestein, P. C. (2018). Best practices for analysing microbiomes, *Nat Rev Microbiol*, 16: 410–422, doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.
- Lagier, J., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Lévassieur, A., Rolain, J.M., Fournier, P.E., Raoult, D. (2018). Culturing the human microbiota and culturomics. *Nat Rev Microbiol*, 16: 540–550, doi: 10.1038/s41579-018-0041-0.
- Liu, X. (2016). Microbiome. *Yale J Biol Med*, 89(3): 275–276, doi: 10.3389/fmicb.2017.02224.
- Nair, H.P., Bhat, S.G. (2020). Metagenomic data on bacterial diversity profiling of Arabian sea sediment by amplicon sequencing, *Data Brief*, 28, doi: 10.1016/j.dib.2019.104791.
- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., Flahaut, C. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *Int J Food Microbiol*, 247: 2-8, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005.

- Nalbantoğlu, U., Cakar, A., Dogan, H., Abaci, N., Ustek, D., Sayood, K., Can, H., (2014). Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiol*, 41: 42-51, doi: 10.1016/j.fm.2014.01.014.
- Parente, E., Ricciardi, A., Zotta, T. (2020). The microbiota of dairy milk: A review. *Int Dairy J*, 107: 104714, doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104714.
- Pothakos, V., Vuyst, L.D., Zhang, S.J., Bruyn, F.D., Verce, M., Torres, J., Callan, M., Moccand, C., Weckx, S. (2020). Temporal shotgun metagenomics of an Ecuadorian coffee fermentation process highlights the predominance of lactic acid bacteria. *Curr Res Biotechnol*, 2:1-15, doi: 10.1016/j.crbiot.2020.02.001.
- Prescott, S.L. (2017). History of medicine: Origin of the term microbiome and why it matters. *Hum Microb J*, 4: 24-25, doi: 10.1016/j.humic.2017.05.004.
- Ranjan, R., Rani, A., Metwally, A.A., McGee, H.S., Perkins, D.L. (2016). Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun*, 469(4): 967-977, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.083.
- Santos, I.C., Hildenbrandbc, Z.L., Schug, K.A. (2016). Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, 141: 2827-2837, doi: 10.1039/C6AN00131A.
- Savaşan, S., Beyaz, D. (2019). Erken Olgunlaşma Dönemindeki Geleneksel Peynir Mikrobiyomunun Metagenomik Analizi. *Vet Mikrobiyol*, 30(1): 27-35, doi: 10.35864/EVMD.586548.
- Serra, J.L., Moura, F.G., Pereira, G.V., Soccol, C.R., Rogez, H.L., Darnet, S. (2019). Determination of the microbial community in Amazonian cocoa bean fermentation by Illumina-based metagenomic sequencing. *Lebensm Wiss Technol*, 106: 229-239, doi: 10.1016/J.LWT.2019.02.038.
- Sielaff, A.C., Urbaniak, C., Mohan, G.B., Stepanov, V.G., Tran, Q.H., Wood, J.M., Minich, J.J., McDonald, D., Mayer, T., Knight, R., Karouia, F., Fox, G.E., Venkateswaran, K. (2019). Characterization of the total and viable bacterial and fungal communities associated with the International Space Station surfaces. *Microbiome*, 7, doi: 10.1186/s40168-019-0666-x.
- Stellato, G., Filippis, F.D., Storia, A.L., Ercolini, D. (2015). Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Appl Environ Microbiol*, 81(22): 7893-7904, doi: 10.1128/AEM.02294-15.
- Sternes, P.R., Lee, D., Kutyna, D.R., Borneman, A.R. (2017). A combined meta-barcoding and shotgun metagenomic analysis of spontaneous wine fermentation. *GigaScience*, 6: 1-10, doi: 10.1093/gigascience/gix040.
- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V.M., Spina, A.A., Soggiu, A., Britti, D., Roncada, P., Piras, C. (2019). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *J proteomics*, 210: 103534, doi: 10.1016/j.jprot.2019.103534.
- Togay, S.O., Capece, A., Siesto, G., Aksu, H., Altunatmaz, S.S., Aksu, F., Romano, P., Yuceer, Y.K. (2020). Molecular characterization of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses. *Food Sci Technol*, doi: 10.1590/fst.24319.
- Topçu, A., Saldamli, I. (2006). Proteolytical, Chemical, Textural and Sensorial Changes During the Ripening of Turkish White Cheese Made of Pasteurized Cows' Milk. *Int J Food Prop*, 9: 665-678, doi: 10.1080/10942910500542238.
- TÜİK (2020). Süt ve Süt Ürünleri Raporu Sayı: 33697, https://ulusalsutkonseyi.org.tr/wp-content/uploads/Haber_Bulteni_mart_2020.pdf (Erişim Tarihi: 10 Temmuz 2020).
- Tunail, N. (2009). *Mikrobiyoloji*. Pelin Ofset Tipo Matbaacılık, Ankara, Türkiye, 434 s. ISBN: 978605-603-62-0-0.
- Verce, M., Vuyst, L.D., Weckx, S. (2020). The metagenome-assembled genome of *Candidatus Oenococcus aquikefiri* from water kefir represents the species *Oenococcus sicerae*. *Food Microbiol*, 88: 103402, doi: 10.1016/j.fm.2019.103402.

- Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K., O'Sullivan, O., O'Sullivan, M. G., Claesson, M. J., Cotter, P. D. (2016). Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir. *mSystems*, 1(5): e00052-16, doi: 10.1128/mSystems.00052-16.
- Wei, Y. J., Wu, Y., Yan, Y. Z., Zou, W., Xue, J., Ma, W. R., Wang, W., Tian, G., Wang, L. Y. (2018). High-throughput sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grape juice and wine of grapevine from China. *PLoS one*, 13(3):e0193097, doi:10.1371/journal.pone.0193097.
- Weiss, H., Hertzberg, V.S., Dupont, C., Espinoza, J.L., Levy, S., Nelson, K., Norris, S., The FlyHealthy Research Team (2019). The Airplane Cabin Microbiome. *Environ Microbiol*, 77(1):87-95, doi: 10.1007/s00248-018-1191-3.
- Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., Dutton, R. J. (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, 158(2): 422-433, doi: 10.1016/j.cell.2014.05.041.
- Wu, L., Lu, Z., Zhang, X., Wang, Z., Yu, Y., Shi, J., Xu, Z. (2017). Metagenomics reveals flavour metabolic network of cereal vinegar microbiota. *Food microbiol*, 62, 23-31, doi: 10.1016/j.fm.2016.09.010.
- Yılmaz R., Temiz, A. Açık, L., Çelebi Keskin, A. (2015). Genetic Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated from Raw Milk Samples Collected from Different Regions of Turkey, *Food Biotechnol*, 29(4): 336-355, doi: 10.1080/08905436.2015.1092091.
- Zhang, L., Loh, K., Lim, J.W., Zhang, J. (2019). Bioinformatics analysis of metagenomics data of biogas-producing microbial communities in anaerobic digesters: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev*, 100: 110-126, doi: 10.1016/J.RSER.2018.10.021.
- Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M.A.P., Harris H.M.B., Mattarelli P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinckii* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(4): 2782–2858, doi: 10.1099/ijsem.0.004107.
- Zhou, L.M., Proctor, L.M., Creasy, H., Fettweis, J.M., Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Zhou, W., Buck, G.A., Snyder, M.P., Strauss, J.F., Weinstock, G.M., White, O.L., Huttenhower, C. (2019). The Integrative Human Microbiome Project. *Nature*, 569: 641-648, doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.



**PÜSKÜRTMELİ KURUTMA VE DONDURARAK KURUTMA
YÖNTEMLERİNİN TEMELLERİ VE BU YÖNTEMLER İLE GIDA
ATIKLARINDAN TOZ ÜRÜNLERİN ÜRETİMİ**

Elif Ezgi Özdemir, Ahmet Görgüç, Esra Gençdağ, Fatih Mehmet Yılmaz*

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

Geliş / Received: 18.01.2021; Kabul / Accepted: 16.03.2021; Online baskı / Published online: 08.04.2021

Özdemir, E.E., Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F.M. (2021). Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemlerinin temelleri ve bu yöntemler ile gıda atıklarından toz ürünlerin üretimi. *GIDA* (2021) 46(3) 583-607 doi: 10.15237/gida. GD21009.

Özdemir, E.E., Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F.M. (2021). Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemlerinin temelleri ve bu yöntemler ile gıda atıklarından toz ürünlerin üretimi. *GIDA* (2021) 46(3) 583-607 doi: 10.15237/gida. GD21009.

ÖZ

Bu derleme makalede gıda atıkları ve/veya yan ürünlerinden gıda bileşenlerinin özütlenerek geri kazanımının ardından püskürtmeli ve dondurarak kurutma yöntemleri ile toz formda ürün üretimine yönelik çalışmalar ele alınmıştır. Gıda atıklarından özütlenen fenolik maddeler, vitaminler, renk maddeleri, aroma maddeleri, proteinler ve lifler gibi bileşiklerin hem dış etkenlere karşı dayanımlarını artırmak hem de gıda formülasyonlarında kullanımını kolaylaştırmak için özütler kurutulmuş toz forma dönüştürülmektedir. Püskürtmeli ve dondurarak kurutucu sistem bileşenlerinin, çalışma prensiplerinin ve işlemlerde etkili faktörlerin de değerlendirildiği bu makalede özellikle son yıllarda gerçekleştirilen, her iki yöntemin bir arada kullanıldığı ve karşılaştırıldığı çalışmalar ele alınmıştır. Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma işlemlerinin ve kurutma yardımcı maddelerinin elde edilen toz ürünlerin verim, higroskopisite, nem içeriği, yapışkanlık, renk, çözünürlük, camsı geçiş sıcaklığı, yığın yoğunluğu, mikroyapı, elektron mikroskobu altındaki görünüm, antioksidan kapasite, antosiyanin ve toplam karotenoid içeriği gibi özellikleri üzerinde etkili oldukları anlaşılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Toz gıda ürünleri, camsı geçiş sıcaklığı, toz ürün üretimi, fonksiyonel toz ürünler, atık değerlendirme

**PRINCIPLES OF SPRAY DRYING AND FREEZE DRYING TECHNIQUES AND
THEIR USE IN POWDER PRODUCTION FROM FOOD WASTES**

ABSTRACT

In this review article, literature studies on the production of powder products by spray and freeze drying methods after the extraction of food components from food waste and/or by-products are discussed. The extracts are dried and converted into powder form in order to increase the stability of compounds extracted from food wastes, such as phenolic compounds, vitamins, coloring and flavoring agents, proteins, fibers, and to ease their use in food formulations. In this article, spray and freeze dryer system components, working principles and effective factors in processes are evaluated,

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: fatih.yilmaz@adu.edu.tr

☎: (+90) 256 213 7503

☎: (+90) 256 213 6686

Elif Ezgi Özdemir; ORCID no: 0000-0003-2800-9376

Ahmet Görgüç; ORCID no: 0000-0003-3018-4595

Esra Gençdağ; ORCID no: 0000-0002-4510-0940

Fatih Mehmet Yılmaz; ORCID no: 0000-0002-1370-1231

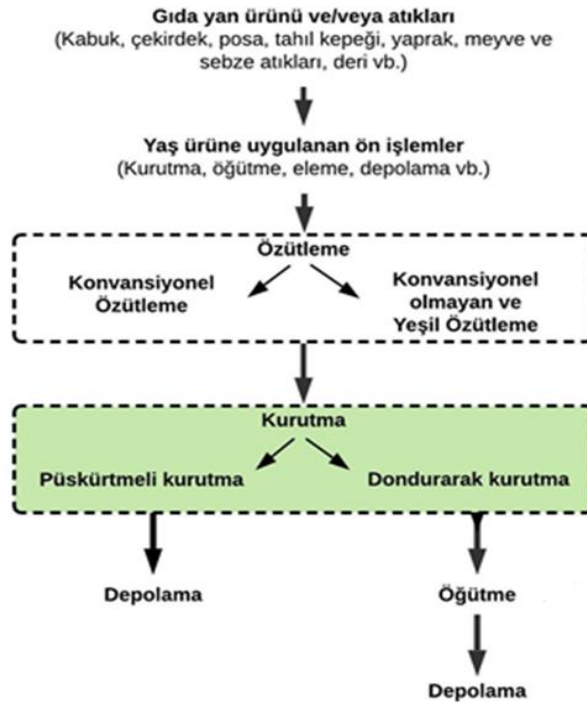
and especially recent studies evaluating both methods are discussed. It is clear that the spray drying and freeze drying processes and drying auxiliaries are effective on powder properties such as the yield, hygroscopicity, moisture content, adhesiveness, color, solubility, glass transition temperature, bulk density, microstructure, appearance under electron microscope, antioxidant capacity, anthocyanin and total carotenoid contents.

Keywords: Powder food products, glass transition temperature, production of powder product, functional powder products, waste valorization

GİRİŞ

Gıda atıkları, gıda yaşam döngüsünün tüm aşamalarında, yani tarımsal üretim, endüstriyel üretim, işleme ve dağıtım sırasında açığa çıkmaktadır (Mirabella vd., 2014). Buna karşın birçok gıda atığının insan sağlığı üzerinde faydaları olduğu bilinen önemli bileşiklerin kaynağı olduğu da iyi bilinmektedir (Bataglion vd., 2015). Özellikle bitki bazlı gıdalar lif, antioksidanlar ve diğer fitokimyasal maddeler (fenolik asitler, flavonoidler vb.) açısından zengin ürünler olarak ilgi çekmektedir (Neacsua vd., 2015). Bitki kaynaklı yan ürünlerden/atıklardan özütlenen steroller, tokoferoller, karotenoidler, terpenler ve polifenoller gibi fitokimyasallar, önemli ölçüde antioksidan kapasiteye sahiptirler. Bu nedenle, bu tür atıklardan izole edilen bileşenler, fonksiyonel

gıda formülasyonlarında doğal antioksidanlar olarak kullanılabilmekte ve raf ömrünü uzatmak için gıda ürünlerinde katkı maddesi olarak birçok alanda değerlendirilmektedir (Kalogeropoulos vd., 2012). Bu bağlamda bu bileşiklerin geri dönüştürülmesi önem kazanmaktadır. Vitaminler, probiyotikler, mineraller, polifenoller, omega-3-yağ asitleri ve fitosteroller gibi bileşikler oksijene, ışığa, yüksek sıcaklığa ve suya oldukça duyarlı olabilmekte; bu faktörlere bağlı olarak da gıda ürünlerinin raf ömrü ve biyoyararlanımı sınırlanmaktadır (Champagne ve Fustier, 2007; Dordević vd., 2015). Kurutma işleminin önemi de burada ortaya çıkmaktadır. Gıda atıklarından ekstraksiyon sonrası toz ürün üretimine yönelik uygulanan genel işlemler Şekil 1’de özetlenmiştir.



Şekil 1. Gıda atıklarından farklı maddelerin özütlenmesi ve toz ürün üretimi

Püskürtmeli kurutma işlemi operasyon kolaylığı ve maliyet etkinliği sağlaması nedeniyle (Botrel vd., 2014) sıvı bir çözeltiyi kuru parçacıklara (toz gıda ve aglomerat) dönüştürmede yaygın olarak kullanılmaktadır (Shishir ve Chen, 2017). Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) ise buzun süblimleşmesine dayanan bir dehidrasyon işlemi olarak tanımlanmaktadır (Marques ve Freire, 2005). Düşük sıcaklık ve basınç kombinasyonu şeklinde uygulanan bu işlem sayesinde nihai üründe renk ve lezzetin çok iyi derecede korunumunun sağlandığı, hızlı su penetrasyonuna ve rehidrasyon yoluyla tazeye yakın özelliklerin geri kazanılmasına olanak tanıdığı (Ceballos vd., 2012) ifade edilmektedir. Burada en önemli nokta kurutma yönteminin gıdanın özelliklerine uygun şekilde seçilmesidir. Uygun kurutma yöntemi seçiminin önemi kurutma işlemi sonrasında elde edilen ürün kalitesinin en üst düzeyde tutulması, üretilen toz ürünün rehidrasyon özelliklerinin iyileştirmesi ve işlem parametrelerinin optimize edilmesi gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır (Morgan vd., 2006).

Bu çalışmada, püskürtmeli ve dondurarak kurutma yöntemleri, gıda atıklarından özütlenen farklı bileşenlerin kurutma yoluyla geri kazanımı, kurutma işlem parametrelerinin son ürün üzerindeki etkileri ve oluşabilecek olumsuzlukları en aza indirmek amacıyla uygulanan işlemler ele alınmıştır. Okuyucuların, bu çalışmada sunulan literatür bulguları ile püskürtmeli ve dondurarak kurutma yöntemleri ve bu yöntemler kullanılarak gıda atıklarından toz ürün üretimi konuları hakkında bilgi edinmeleri amaçlanmıştır.

GIDA ATIKLARI VE ATIKLARDA BULUNAN BİYOAKTİF MADDELER

Gıda atıkları genellikle gıda hammaddelerinin hasat edilmesi, işlenmesi veya nakliyesi sırasında açığa çıkan, sıvı veya katı formdaki organik kalıntılardır. Bu maddeler üretim sürecinden istenmeyen materyaller olarak uzaklaştırılmaktadırlar. Gıda işleme endüstrisinin her yıl sadece Avrupa Birliği'nde 100 milyon ton civarında gıda atığı ve yan ürünü ürettiği bilinmektedir. Bu durum, toplam hasadın üçte birinden fazlasının hasat ve gıda işleme sırasında kaybolduğu veya atıldığı anlamına gelmektedir.

Gıda üretim, işleme, dağıtım ve depolama gibi gıda tedarik zincirinin farklı aşamaları sırasında en fazla oranda gıda atığı açığa çıkan gıda prosesleri incelendiğinde içecek endüstrisinin %26'lık kayıp ile ilk sırada olduğu, bunu %21.3 ile süt ve dondurma endüstrisinin, %14.8'lik kayıpla ise meyve ve sebze endüstrisinin takip ettiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Arshadi vd., 2016).

Genel olarak gıda atıkları karbonhidratlar (nişasta, selüloz, hemiselüloz veya lignin), proteinler, lipitler, organik asitler ve daha küçük inorganik kısımlardan oluşan heterojen bir yapıya sahiptirler. Bu atıklar günümüzde çoğunlukla hayvan yemi ve kompost olarak geri dönüştürülmekte, kalan atıklar ise yakılarak imha edilmektedir. Bu durum da sera gazı olarak karbondioksitten 23 kat daha fazla oranda ve iklim değişikliğine önemli ölçüde etkisi bulunan metan gazı emisyonuna neden olmaktadır (Lin vd., 2013). Sanayileşme ve küresel nüfus artışı ile birlikte gıda endüstrisi tarafından üretilen atık maddelerin bertarafı ciddi çevresel sorunlar yaratmaktadır. İşleme tesislerindeki çevresel atıklar yenilikçi işleme yöntemleri kullanılarak yeniden kullanım yoluyla önemli ölçüde azaltılabilmektedir. Günümüzde atık maddeleri biyoyakıtlara, gıda bileşenlerine ve diğer katma değerli biyoürünlere dönüştürmeyi amaçlayan, atıkların ve yan ürünlerin bir kaynak haline geldiği çeşitli süreçler geliştirilmektedir (Makris, 2007).

Gıdaların işlenmesi sonucu oluşan yan ürünler ve/veya gıda atıkları aynı zamanda polisakkaritler, lezzet bileşikler, enzimler, polifenoller, uçucu yağlar, pigmentler, besinsel lifler, proteinler (Zhu vd., 2016), antioksidanlar ve renklendiriciler gibi değerli işlevsel bileşiklerin eldesinde kullanılabilirler. Bu kaynaklar bol ve ucuz, uygun teknolojik ve/veya beslenme özelliklerine sahip bileşikler için önemli kaynaklar olduklarından ticari açıdan değerli ürünlerin üretiminde kullanılabilirler (Luque ve Clark, 2013).

Son yıllarda polifenoller, karotenoidler, peptitler, steroller veya çoklu doymamış yağ asitleri gibi doğal biyoaktiviteye sahip bileşikler içeren

fonksiyonel gıdalara olan talep gün geçtikçe artmakta, bu bağlamda fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi için gıda endüstrisi tarafından sürdürülebilir ve yeni fonksiyonel bileşenler talep edilmektedir (Herrero vd., 2015). Bu sebeple, gıda sanayisinde birçok gıdanın işlenmesinde ve üretiminde oluşan bitkisel ve hayvansal yan ürün ve/veya atıkların farklı amaçlarla kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle bitkisel gıdalar, işleme sonucunda çok miktarda yan ürün üretmesi nedeniyle ilgi odağı haline gelmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalar bu yan ürünlerin birçoğunun potansiyel olarak değerli bileşenlerin kaynağı olabileceğini de ortaya koymuştur (Yılmaz vd., 2021). Örneğin, buğdayın öğütülmesi, pirinç kabuklarının ayrıştırılması veya yulafın öğütülmesi sonucu protein ve besinsel lifler açısından zengin olan kepek veya saman gibi yan ürünler üretildiği ve bu atıklardan antioksidan peptit (Zaky vd., 2020), protein (Chen vd., 2021) ve çözünebilir diyet lifi (Yan vd., 2019) gibi bileşiklerin elde edildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, bitkisel yan ürünlerden ve/veya atıklardan elde edilen fenoller ve karotenoidler, gıda endüstrisinde doğal gıda veya içecekler için fonksiyonel bileşenler olarak kullanılabilirler (Oreopoulou ve Tzia, 2007). Örnek olarak, palm yağı üretimi sonucu açığa çıkan küspeden (Tsouko vd., 2019), kestane yapraklarından (Munekata vd., 2016) ve zeytinyağı üretimi sırasında oluşan pirina, zeytin yaprağı ve karasudan fenolik bileşiklerin (Venturi vd., 2017) veya zeytin sirkesi (De Leonardis vd., 2018) eldesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Şekerleme ürünlerinde jelleştirici olarak veya et ürünlerinde yağ yerine kullanılabilen pektinin (Galanakis vd., 2010) ticari olarak üretimi için ana kaynak narenciye kabuklarıdır (Putnik vd., 2017). Kakao kabuğu (Chan ve Choo, 2013), nar kabukları (Pereira vd., 2016) ve muz kabuğu (Oliveira vd., 2016) da değerlendirilen diğer bitkisel gıda atıklarındandır. Suda çözünmeyen lifler de bağırsak fonksiyonlarının düzenlenmesini sağlayan, fonksiyonel gıda üretiminde kullanılan bileşiklerdir (Rodríguez vd., 2006). Ginseng bitkisinin atıklarından (Hua vd., 2019) çözünmeyen lif, domates kabuklarından (Gu vd., 2020) çözünür lif; portakal kabuğundan ise flavonoidler (Pereira vd., 2017), uçucu yağlar (Hashtjin ve Abbasi, 2015) ve karotenoidlerin

(Murador vd., 2019) geri kazanımını ele alan literatür bulguları mevcuttur.

TOZ ÜRÜNLER VE TOZ (KURU) ÜRÜN ÜRETİM AVANTAJLARI

Tüketim davranışlarındaki son gelişmeler, özellikle gıda ve tüketim alanlarının çeşitlenmesi, gıda şirketlerini formülasyon programlarını geliştirmeye itmektedir. Yeni bir ürünün geliştirilmesi sürecinde gıdanın korunması, taşınması, depolanması, tartılması ve işlenmesi kolay işlevsel bileşenler kullanmayı da beraberinde getirmektedir (Cuq vd., 2011). Gıdaların toz forma dönüştürülmesi de bu noktada önem kazanmaktadır. Toz gıda, küçük ve gevşek parçacıklar şeklindeki kuru bir katı gıda ürünü olarak ifade edilebilir. Bu ürünler sağlık için temel besinleri sağlamasının ötesinde spesifik ve faydalı bir fizyolojik etki sağlamak üzere tasarlanmışsa o zaman fonksiyonel toz ürün olarak adlandırılmaktadır. Taze veya sulu/yaş bir katıdan toz gıda üretimiyle ilgili ana işlemler, kurutma ve/veya boyut küçültme şeklinde özetlenebilmektedir (Chronakis vd., 2004). Gıda işleme sırasındaki uygulamalarda ve ürün formülasyonlarında kolaylık sağlamak, duyuşal çekiciliği artırmak, ürünün besin içeriğinin iyileştirilmesi gibi sebeplerden ötürü birçok gıdanın toz formda kullanımı tercih edilmektedir (Dhanalakshmi vd., 2011). Bu bağlamda tüm gıda ürünlerinin yaklaşık %80'inin kuru (toz, susuz parçacıklar vb.) forma dönüştürülebileceği ifade edilmektedir (Burgain vd., 2017). Bu ürünlere yumurta tozları, süt tozları, jelatin tozları, gıda katkı maddeleri, vitaminler, meyve ve sebze tozları, baharatlar, renklendirici maddeler örnek olarak verilebilir. Gıda ürünlerinden veya atıklarından elde edilen bu tozlar kullanım ve saklama kolaylığı sağlaması açısından gıda endüstrisinde geniş kullanım alanı bulmaktadır (Cuq vd., 2011).

Tozların, bileşimini ve işlevselliğini daha karmaşık hale getiren bileşenlerin kompleks bir karışımı olduğunu belirtmek gerekmektedir. Gıdalardaki makro bileşenlerin (su, karbonhidrat, protein ve yağlar) fiziksel durumundaki herhangi bir değişiklik, gıda tozunun minör bileşenlerinin (vitamin, fenolik bileşikler vb.) kimyasal

özelliklerini de etkilemektedir. Örneğin gıdanın su içeriğinin yüksek olması toz üründe yapışkanlık ve katılaşma gibi istenmeyen fiziksel değişikliklere yol açarak ürünün depolama stabilitesinin azalmasına neden olabilmektedir. Benzer şekilde, lipit ve protein oksidasyonu ile enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları istenmeyen karakteristik tatların oluşumuna, renk bozulmasına ve besin değeri kaybına yol açmaktadır (Burgain vd., 2017). Dolayısıyla, kurutma yönteminin gıdanın özelliklerine uygun şekilde seçilmesi önem arz etmektedir. Uygun kurutma işlemi seçiminin önemi kurutma işlemi sonrasında elde edilen ürün kalitesinin en üst düzeyde tutulması, üretilen toz ürünün rehidrasyon özelliklerinin iyileştirmesi ve işlem parametrelerinin optimize edilmesi gibi konularda ortaya çıkmaktadır (Morgan vd., 2006). Böylece depolama, karıştırma ve rehidrasyon gibi işlemlerin etkinliğini artırmak, toz ürünlerin davranışını belirlemek ve kontrol altına almak da kolaylaşmaktadır (Ermiş ve Karasu, 2019).

PÜSKÜRTMELİ KURUTMA

Püskürtmeli kurutma, yüksek su içeriğine sahip pompalanabilir sıvıların kurutulmasında ölçeklenebilirliği, sürekli çalışması ve standart kalite özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir (Yerlikaya ve Şen Arslan, 2019). Ayrıca, bu kurutma yöntemi kısa uygulama süresi ve kolay kontrol edilebilir çalışma koşullarına sahiptir. Püskürtmeli kurutma işlemi çeşitli ürün gruplarını işleme potansiyelinin yanında renk, lezzet ve besin değeri gibi özellikleri yüksek ölçüde korunabilen ürünler için ideal bir kurutma sistemi olarak öne çıkmaktadır (Haque vd., 2015). Tüm bunlara ek olarak, ekonomik olması, toz ürünlerde partikül yoğunluğu, yığın yoğunluğu ve kristallenme derecesi gibi parametreler üzerinde kontrol kolaylığı sağlaması bu kurutma sisteminin avantajlarını artırmaktadır (Haggag ve Faheem, 2015).

Püskürtmeli kurutma işlemi, sıcak hava veya inert gaz gibi bir akışkan yardımıyla sulu veya organik çözeltilerin atomizasyonu ve ardından kurutulmasını içermektedir (Haque vd., 2015). Sistemdeki akışkan, kurutma ortamına küçük damlacıklar halinde püskürtülmekte ve bu damlacıklar sıcak gaz/hava ortamına doğru

hareket ederek küçük parçacıklar şeklinde kurumaktadır (Nuzzo vd., 2015). Besleme bileşimine ve işlem koşullarına bağlı olarak elde edilen nihai parçacıklar çok ince nano boyutlu tozlar (210-280 nm), mikron boyutunda ince tozlar (10-50 µm) veya aglomeratlar (3 mm'ye kadar) olabilmektedir (Gharsallaoui vd., 2007).

Püskürtmeli kurutma ile üretilen tozların kalitesi, sisteme beslenen çözeltilerin özelliklerine (viskozite, akış hızı vb.), kurutma havasına (basınç/sıcaklık ve akış hızı), sıcak hava ile kurutma odasındaki damlacıklar arasındaki temas oranı veya mesafeye, kullanılan atomizer türüne (eş zamanlı veya ters akım) ve hızına bağlı olarak değişmektedir (Shishir ve Chen, 2017). Buna ek olarak, kurutulmuş ürünün özellikleri ise beslenen ürünün fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanında kurutucu sistem tasarımına ve işlem parametrelerine bağlı olarak belirlenmektedir (Keshani vd., 2015). Dolayısıyla, püskürtmeli kurutulmuş tozların kalitesi, akış özelliği, sıkıştırılabilirlik, kütle yoğunluğu, dağılılabilirlik, çözünürlük, ürün kompozisyonu ve püskürtmeli kurutma işlem parametrelerine bağlı olarak değişmektedir (Haque vd., 2015). Tipik bir püskürtmeli kurutucu sisteminin şematik gösterimi Şekil 2'de verilmiştir.

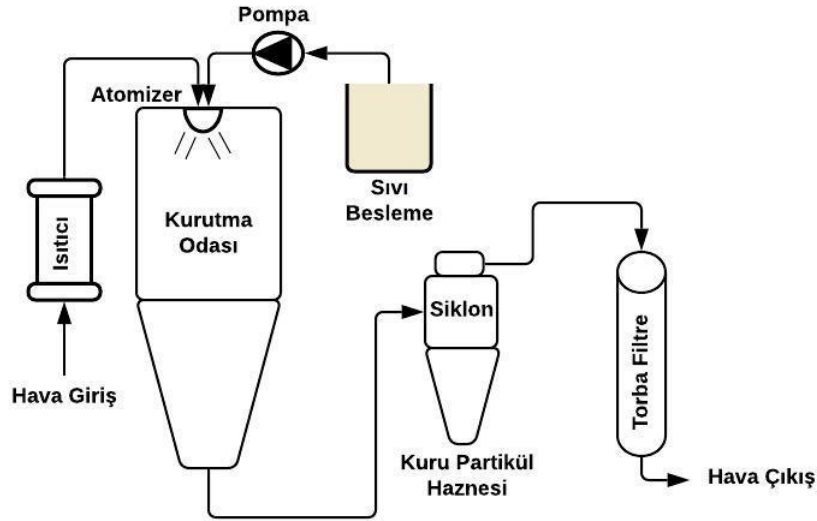
Püskürtmeli kurutma işlemi temel olarak (I) Sisteme beslenecek sıvının ince damlacıklar halinde atomize edilmesi, (II) Damlacıkların sıcak hava ile teması, (III) Atomize edilen damlacıkların kurutulması ve (IV) Kurutulmuş damlacıkların nemli havadan ayrılması olmak üzere dört adımdan oluşmaktadır (Malamatari vd., 2020).

Atomizasyon

Atomizasyonun temel amacı daha geniş yüzey alanı ve daha verimli bir ısı ve kütle aktarımı sağlayarak beslenen sıvı ürünün kurutma yüzey alanını artırmaktır. Atomizasyon işlemi için döner atomizerler, hidrolik nozullar, pnömatik nozullar ve ultrasonik nozullar gibi sistemler kullanılmaktadır (Cal ve Sollohub, 2010). Püskürtmeli kurutma işleminde atomizer tasarımı, atomizasyon basıncı ve atomizasyon hızı gibi parametreler toz ürünün fiziksel (boyut, şekil vb.) özelliklerini önemli derecede etkilemektedir

(Shishir ve Chen, 2017). Kurutma sırasında atomize edilmiş damlacıklar ve sıcak hava bir kurutma bölgesinde etkileşime girerek damlacık sıcaklığını artırmaktadır. Bu durum ise küçük su damlacıklarının buharlaşma hızının artmasını sağlamaktadır. Bu süreçte damlacık yüzeyinde kuru bir tabaka oluşurken, damlacıktaki nem içeriği de kritik noktaya ulaşmaktadır. Sonuçta elde edilen toz parçacıklar hammaddenin yapısına ve kurutma koşullarına bağlı olarak pürüzsüz veya pürüzlü; küresel veya oval şekilli olabilmektedir (Caparino vd., 2012). Örneğin, atomizasyonu sağlamak için uygulanan enerji ne kadar yüksek olursa damlacıklar/parçacıklar o kadar küçük

boyutta olacaktırlar (Gharsallaoui vd., 2007). Chegini ve Ghobadian (2005) yaptıkları çalışmada daha yüksek atomizer hızında daha küçük damlacıkların oluştuğunu ve bununla birlikte temas yüzeyinin artmasıyla daha fazla nem buharlaştırılabildiğini göstermişlerdir. Bu sayede de küçük parçacık boyutu ve hızlı kuruma sağlandığını, sonuç olarak damlacıkların üzerinde kabuk oluşumunun önlendiği bildirilmiştir. Yüksek atomizer basınçlarında toz ürünün parçacık boyutu ve nem içeriği azalırken katı yüzdesi ve yığın yoğunluğunun arttığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Tee vd., 2012).



Şekil 2. Püskürtmeli kurutma sisteminin şematik gösterimi

Damlacık-Sıcak Hava Teması

Damlacık-hava teması beslenen ürünün atomizasyonundan hemen sonra kurutma odasında gerçekleşmektedir. Bu aşamada, havanın termal enerjisi buharlaşma için kullanılmakta ve soğumuş hava kurumuş partikülleri kurutma sistemi boyunca pnömatik olarak taşımaktadır (Phisut, 2012). Bu süreç atomize edilmiş damlacıkların suyun buharlaşmasını kolaylaştıran ısıtılmış hava ile karşılaşması şeklinde özetlenebilir. Püskürtmeli kurutma işleminde sıcak hava geniş bir hacimde kurutma odasında dolaşmaktadır. Dolayısıyla bu kurutma sisteminin

termal etkinliği oldukça düşüktür. Ayrıca, damlacık boyutunun kontrolünün de sınırlı olması geniş boyutlu parçacık dağılımına ve bazen de düzensiz mikro yapıya neden olabilmektedir (Dalmoro vd., 2012). Bu sebeple son ürünün yüksek verimle toplanabilmesi için tozun kurutma odası duvarlarına temas etmeden önce yeterince kurumuş olması gerekmektedir (Haque vd., 2015). Duvara parçacık yapışma durumu genellikle meyve suyu gibi şeker ve organik asit içeriği yüksek ürünlerde görülmektedir. Yapışma sorunu ise esas olarak sükröz, glikoz ve fruktoz gibi düşük molekül ağırlıklı şekerler ile organik asitlerin

düşük camısı geçiş sıcaklığından (T_g) kaynaklanmaktadır (Goula, 2017). Yüzey toz birikmesi veya yapışması aynı zamanda kurumuş parçacıklar ve kurutma odası iç yüzeyi arasındaki kaçınılmaz temastan kaynaklanmaktadır. Birçok üründe, tortular belirli bir kalınlığa kadar biriktikten sonra düşmektedir (Goula ve Adamopoulos, 2010). Buna karşın eğer materyal kuruyana kadar ekipman duvarlarına temas etmezse püskürtmeli kurutma işlemi süresince daha az yapışma ve korozyon gerçekleşeceği belirtilmektedir (Chegini vd., 2008).

Atomize Damlacıkların

Kurutulması/Buharlaştırılması

Kurutma işleminde sisteme beslenen damlacıklar, sıcak hava ile temas ettiği anda suyun buharlaşması ile kurumakta ve bu sırada kuru toz parçacıkları oluşmaktadır. Daha genel bir ifadeyle, kurutma işlemi ilk olarak kurutma odasında damlacıkların hava ile temasıyla başlamaktadır. Isı transferi ise suyun damlacıklardan buharlaştığı ıslak termometre sıcaklığına ulaşana kadar artmaya devam etmektedir. Kurutma işleminde suyun buharlaşması sabit sıcaklıkta ve su buharı kısmi basıncında gerçekleşmektedir. Son olarak damlacık yüzeyinde kuru bir kabuk oluştuktan sonra kurutma oranı azalmakta ve difüzyon hızına bağımlı hale gelmektedir. Kurutma havası sıcaklığı ile partikül sıcaklığı eşitlendiğinde ise kurutma işlemi tamamlanmaktadır (Gharsallaoui vd., 2007). Kurutulmuş parçacıklar, kurutma odasından çıktıkları anda kurutucu çıkış sıcaklığına yakın durumdadırlar. Kurutma işlemi süresince her damlacığın yüzeyinden hızlı buharlaşma meydana gelmektedir. Sıcak hava, kurutucuya beslenen ürünün damlacıklarına temas ettiği anda büyük çoğunlukla kuruma işlemi de gerçekleşmiş olacaktır. Bu hızlı buharlaşma aynı zamanda beslenen ürün tamamen kuruyana kadar damlacıkların yüksek sıcaklığa maruz kalmasını önlemektedir (Shishir ve Chen, 2017).

Püskürtmeli kurutma işlemindeki son adım ise kurutulmuş parçacıkların nemli havadan ayrılarak bir haznede toplanmasıdır. Bu esnada üründen uzaklaştırılan nem ise genellikle siklon ve kurutma odasının dışına yerleştirilen bir torba filtre ile kurutma ortamından uzaklaştırılmaktadır.

Taneciklerin kurutma ortamından ayrılmasının etkinliği taneciklerin yoğunluğuna, boyutuna ve bunların siklon içindeki çökme hızına bağlı olarak değişmektedir (Haque vd., 2015). Ürün geri kazanımı esas olarak toz ürün toplama verimliliği ile belirlenmektedir. Bir püskürtmeli kurutma sistemindeki ürün kaybı çoğunlukla püskürtülmüş damlacıkların ve kuru tozun aparatın duvarına tutunmasından ve siklonun ince parçacıklar toplamadaki etkinliğinin yetersiz olmasından kaynaklanmaktadır (Goula vd., 2004).

Püskürtmeli Kurutma Parametrelerinin Toz Ürün Özelliklerine Etkisi

Toz ürünlerin fiziksel özellikleri arasında parçacık (partikül) şekli, yoğunluk, gözeneklilik, yüzey özellikleri, parçacık çapı ve boyutunu saymak mümkündür. Kurutulmuş toz ürünlerin fizikokimyasal özellikleri, kurutma işlemi süreçlerini ve işlevselliği optimize etmek ve maliyetleri azaltmak açısından önem arz etmektedir (Barbosa-Cánovas ve Juliano, 2005). Örneğin, partikül boyutunun azalması veya partikül yüzey alanındaki artış, neme karşı daha yüksek bir afiniteye ya da kurutma işlemi sırasında aglomerasyona (kümeleşme) neden olabilmektedir (Chindapan vd., 2018). Toz ürünün yoğunluk bilgisi ise işleme, paketleme, depolama ve dağıtım koşullarının ayarlanmasında malzeme bilimi çalışmaları ve endüstriyel süreçler için önemli avantajlar sağlamaktadır. Buna ek olarak, yığın yoğunluğu değeri öğütme veya kurutma ile elde edilen nihai ürünü karakterize etmek için kullanılmaktadır (Barbosa-Cánovas ve Juliano, 2005). Ayadi vd. (2008), püskürtmeli kurutma işlem koşullarının kurutulmuş yumurta akı ve bütün yumurta tozlarının özellikleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Yazarlar, kurutma esnasındaki besleme akış hızına ve giriş havası sıcaklığına bağlı olarak spesifik köpüklenme, jelleşme ve emülsifiye edici özelliklere sahip toz ürün elde edildiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, son üründe istenen özellikleri elde etmek için püskürtmeli kurutma işlemi sırasında farklı parametreler kontrol edilerek yüksek kalitede tozlar elde edilebilmektedir. Bu sayede yapışkanlık, higroskopik özellikleri ve düşük çözünürlük gibi

bazı yapısal dezavantajların da önüne geçilebilmektedir (Vidović vd., 2014).

Hava Giriş/Kurutma Sıcaklığı

Kurutma sıcaklığı, püskürtmeli kurutulmuş tozun fizikokimyasal özelliklerini etkileyen önemli faktörlerden birisidir (Shishir ve Chen, 2017). Daha yüksek hava giriş/kurutma sıcaklığının kurutma hızını artırarak toz ürün veriminde artış sağladığı; bunun yanında artan kurutma hızı ile birlikte toz ürünün nihai nem içeriği ile kütle yoğunluğunun da önemli ölçüde etkilendiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Jafari vd., 2017). Diğer yandan yüksek kurutma sıcaklıklarının kullanılması, toz üründe yer alan ısıya hassas değerli bileşenleri yok etme ve camsı geçiş sıcaklığının aşılması suretiyle yapışkanlığı artırma riski de taşımaktadır (Looi vd., 2019). Muzaffer ve Kumar (2015), demirhindi özünden püskürtmeli kurutma sistemi ile toz ürün elde ettikleri çalışmalarında hava giriş sıcaklığındaki artışla birlikte meydana gelen ısı ve kütle aktarımındaki artışın, verimliliği artırdığını tespit etmişlerdir. Yüksek kurutma sıcaklığı, kurutma odasına daha fazla ısı transferi sağlaması nedeniyle kurutma hızını arttırarak kurutulmuş ürünün nem içeriğini azaltmaktadır. Ayrıca toz ürünün kalıntı nem içeriğinin azalması sebebiyle ortalama ıslanabilirlik süresinde bir artışa, yani ıslanabilirlik özelliklerinde azalmaya neden olmaktadır (Chegini ve Ghobadian, 2005). Benzer şekilde, Sun vd. (2020) püskürtmeli kurutma sıcaklığının mikroenkapsüle karvakrol tozlarının fiziksel özellikleri üzerindeki etkilerini incelemiş ve nem içeriği ile yığın yoğunluğunun kurutma sıcaklığındaki artışla azaldığı sonucuna varmışlardır. Jafari vd. (2017) ise hava giriş sıcaklığının nar suyu tozunun fonksiyonel özellikleri üzerindeki etkisini incelemiş ve giriş hava sıcaklığının artmasıyla birlikte protein çözünürlüğünün azaldığını tespit etmişlerdir. Püskürtmeli kurutulmuş ürünün parçacık boyutu, kurutma giriş sıcaklığına bağlı olarak değişebilmektedir. Kurutma sıcaklığındaki artış, kürelerin düzgün şekilde büzülmesine izin vermeden büyük partikül oluşumuna neden olan hızlı bir su buharlaşmasına neden olmaktadır. Büyük partiküller genellikle daha gözenekli bir

yapıya sahip olduğundan partikül yoğunluğunda azalma eğilimi gözlenmektedir (Fazaeli vd., 2012).

Hava Çıkış Sıcaklığı

Toz parçacıklarının nemli havadan ayrılıp siklonun dibine bırakıldığı andaki siklon sıcaklığı, hava çıkış sıcaklığı olarak kabul edilmektedir. Hava çıkış sıcaklığı, toz halindeki ürünlerin kurutma sürecini ve fizikokimyasal özelliklerini kontrol etmede kullanılan önemli bir parametredir (Shishir ve Chen, 2017). Püskürtmeli kurutma işleminde kurutma çıkış sıcaklığının daima düşük tutulması ve kurutmanın mümkün olduğunca hızlı gerçekleştirilmesi, sıcaklığa duyarlı proteinler ve peptitler açısından ürünün bozulmasını/denatürasyonunu önlemek adına önem arz etmektedir (Prinn vd., 2002). Yüksek çıkış sıcaklığının nem içeriği ve proses verimini artırdığı bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Tontul ve Topuz, 2017). Hava çıkış sıcaklığının toz özellikleri üzerinde önemli etkileri vardır. Maa vd. (1997), düşük hava çıkış sıcaklığının toz partiküllerin küreselliğini artırdığını belirtmiştir. Yazarlar ayrıca hava çıkış sıcaklığının besleme akış hızı ve atomize hava akış hızının artışına bağlı olarak azaldığını tespit etmişlerdir. Bu durum hava çıkış sıcaklığının diğer kurutma parametrelerinden etkilendiği gerçeğini desteklemektedir. Hava giriş ve çıkış sıcaklıkları arasındaki fark ne kadar fazla ise sıcaklık ve buhar basıncı gradyanları da o derece yüksek olacak; bu durum ise buharlaşma ve parçacık oluşumunun daha hızlı gerçekleşmesini sağlayacaktır (Haque vd., 2015).

Besleme Akış Hızı

Besleme akış hızı, püskürtmeli kurutma düzenine kapasitesi de dikkate alınarak bir sıvı materyalin toz ürün kalitesi ve verim ele alınarak kurutulmasında önemli parametrelerden birisi olarak kabul edilmektedir (Miller ve Gil, 2012). Muzaffer ve Kumar (2015), püskürtmeli kurutma işleminin yüksek besleme hızında gerçekleştirildiğinde meydana gelen yavaş ısı ve kütle aktarımının işlem verimi üzerinde olumsuz bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, besleme akış hızındaki artış ve hava giriş sıcaklığındaki azalmanın, toz örneklerin nem içeriğini doğrusal yönde etkileyen bir değişken

olan higroskopik özelliğini azalttığı tespit edilmiştir.

Besleme akış hızı temel olarak atomizer hızı ile doğru orantılı olarak değişmektedir. Yüksek akış hızına sahip besleme, aynı miktarda nemi damlacıklardan buharlaştırmak için daha fazla enerjiye ihtiyaç duymakta, dolayısıyla daha yavaş ısı ve kütle transfer hızına neden olarak damlacıkların kurumasını zorlaştırmaktadır (Shishir ve Chen, 2017). Benzer şekilde Kurozawa vd. (2009), yaptıkları çalışmada tavuk eti tozlarındaki nem içeriğinin, daha yüksek besleme hızının damlacıklar ile kurutma havası arasındaki temas süresini azaltması nedeniyle düşük verimli bir ısı transferine ve daha düşük oranda su buharlaşmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise yüksek hava giriş sıcaklığı, düşük besleme akış hızı, yüksek atomizasyon basıncı ve yüksek hava akış hızında toz ürün nem içeriğinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Telang ve Thorat, 2010). Bununla birlikte, yüksek hava akış hızında ve düşük besleme akış hızında daha yüksek ürün verimine ulaşıldığı belirlenmiştir. Diğer yandan Souza vd. (2009), kurutucu sisteme beslenen çözelti yoğunluğunun besleme akış hızı ve atomizasyon hızı ile ters orantılı olduğunu, atomizer hızı ile besleme akış hızının ise domates tozunun parçacık boyutu üzerinde önemli bir etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Hava Akış Hızı

Kurutma havası akış hızı, buharlaşma için gereken süreyi etkilemesi sebebiyle püskürtmeli kurutma işleminde önemli bir faktördür. Kurutma havası akış hızı suyun buharlaşma hızını etkilemektedir. Düşük hava akış hızı damlacıkların kuruma süresini artırırken yüksek kuruma süresi daha fazla miktarda suyun buharlaşmasına neden olmaktadır (Goula vd., 2004). Yüksek hava akış hızı daha kısa kurutma süresi sağlamasına karşın yetersiz oranda bir kurutma sağlaması nedeniyle nihai üründe yüksek nem içeriğine neden olabilmektedir (Shishir ve Chen, 2017).

Püskürtmeli kurutma işlemi esnasında iç duvarlarda biriken ürünler iki kategoriye ayrılmaktadır: Duvara çarpmadan önce yeterince

kuru olmayan damlacıkların neden olduğu yarı ıslak tortular ve kurutma sıcaklığında ürünün doğasından kaynaklı yapışkan tortular (Goula ve Adamopoulos, 2010). İlk kategorideki tortu oluşumu aynı zamanda işlem veriminin azalmasına da neden olan hava akış hızının azaltılması ile gerçekleşmektedir. Benzer şekilde, yüksek hava akış hızı damlacık çaplarında azalmaya neden olmakta ve küçük parçacık boyutlu damlacıklar kurutma odasında nem içeriğinin çok daha düşük olduğu kısımlarda duvara çarpma eğilimi göstermektedirler (Fazaeli vd., 2012).

Toz Ürün Verimi

Püskürtmeli kurutma işleminin verimliliği, buharlaştırmada kullanılan ısının toplam ısı girdisine oranı olarak tanımlanmaktadır (Goula ve Adamopoulos, 2003). Fazaeli vd. (2012)'nin çalışma verilerine göre yüksek hava giriş sıcaklığı proses veriminde ve çözünürlükte artış sağlarken yığın yoğunluğu, nem içeriği ve su aktivitesi değerinde azalma meydana getirmektedir. Buna karşın, hava akış hızı artışının kurutma verimi ve kütle yoğunluğu üzerinde olumlu; çözünürlük, nem içeriği ve su aktivitesi değeri üzerinde ise olumsuz bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.

Kurutma işlemi etkinliği adına önemli bir gösterge olan toz ürün verimliliği ise kurutma sonrası elde edilen toplam toz madde kütesinin başlangıçta sisteme beslenen çözeltide yer alan toplam kuru madde kütesine oranı olarak tanımlanmaktadır. Nihai toz ürünün verimi ve fiziksel özellikleri, besleme konsantrasyonu, besleme akış hızı, atomizasyon hızı/basıncı ve kurutma sıcaklığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (Tontul ve Topuz, 2017). Düşük ürün verimi ise temel olarak özellikle şekerler gibi bazı gıda bileşenlerinin yapışkanlık özelliklerinden ileri gelmektedir (Can Karaca vd., 2016). Örnek olarak León-Martínez vd. (2010), yaptıkları bir çalışmada en düşük toz ürün veriminin yüksek toz nem içeriği ve düşük hava çıkış sıcaklığına neden olan yüksek besleme akış hızı ve düşük giriş sıcaklığı koşullarında elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu kurutma koşulları altında, kurutma odasının duvarında yapışmaların görüldüğü de ayrıca vurgulanmıştır. Aynı çalışma sonuçlarına göre verim üzerinde besleme akış

hızının atomizer hızından daha büyük bir etkiye sahip olduğu, bununla birlikte sabit besleme hızında atomizasyon hızı arttıkça verimin de arttığı tespit edilmiştir. Başarılı bir püskürtmeli kurutma işleminde ürün veriminin %50'den yüksek olması gerektiği bildirilmektedir (Elez Garofulic vd., 2016).

Püskürtmeli Kurutma İşleminde Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Püskürtmeli kurutma işleminde dikkat edilmesi gereken noktaların başında ürünün camsı geçiş sıcaklığı gelmektedir. Camsı geçiş sıcaklığı sert, katı ve amorf bir maddenin yumuşak, kauçuk benzeri ve sıvı bir faza dönüştüğü sıcaklıktır. Camsı geçiş sıcaklığının saptanması için yaygın olarak kullanılan ölçüm yöntemi ise camsı geçiş sıcaklığı aralığında meydana gelen, cam ve kauçuksu durumlar arasındaki şekilsiz bileşenin ısı akışındaki değişikliği tespit eden diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) cihazıdır (Fazaeli vd., 2012).

Püskürtmeli kurutulmuş gıdalar yapışkan ve yapışkan olmayan olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Yağsız süt, maltodekstrin, zamksı maddeler ve proteinlere ait çözeltilerden yapışkan olmayan; meyve-sebze suları ve bal gibi şeker ve asit açısından zengin gıdalardan ise yapışkan karakterde toz ürünler elde edilmektedir. Şeker ve asitçe zengin malzemelerin yapışkan toz davranışı genel olarak fruktoz (-5 °C), glikoz (32 °C), sükroz (62 °C) gibi şekerlerin düşük camsı geçiş sıcaklığından ve sitrik, malik ve tartarik asit gibi organik asitlerin varlığından kaynaklanmaktadır (Adhikari vd., 2003). Bu bileşenler püskürtmeli kurutma işlemi esnasında kurutucu duvarlarına yapışma ve toz yerine macun benzeri bir yapı oluşturma eğilimi göstermektedirler (Goula ve Adamopoulos, 2010). Bir ürünün camsı geçiş sıcaklığını ise sıcaklık, nem ve ürün bileşimi olmak üzere üç temel faktör etkilemektedir (Intipunya ve Bhandari, 2010).

Düşük camsı geçiş sıcaklığı püskürtmeli kurutma işlemi sırasında istenmeyen fiziksel değişikliklere (yapışma, kabuk bağlama, topaklanma vb.) neden olabilmektedir. Aynı zamanda, üründe renk ve

aroma değişikliklerinin yanında bazı kimyasal değişiklikler de meydana gelebilmektedir. Bu sebeple, bu tarz istenmeyen durumların önüne geçmek için parçacıkların yüzey sıcaklığının kurutulacak ürün camsı geçiş sıcaklığının en az 20 °C altında olması önerilmektedir (Fazaeli vd., 2012). Ürün nem içeriği de camsı geçiş sıcaklığının düşürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Toz ürünlerin birçoğu %5'ten düşük nem içeriğine sahip olmasına rağmen nem içeriğindeki %1 gibi küçük bir artışın camsı geçiş sıcaklığını önemli ölçüde azaltabildiği vurgulanmaktadır (Intipunya ve Bhandari, 2010). Bu sebeple beslenen ürünlerin camsı geçiş sıcaklığını yükseltmek için farklı teknolojilerin kullanımı tavsiye edilmektedir. Bu yöntemler kurutulacak ürünün yüksek nişasta, şeker veya yağ içeriğine sahip olduğu durumlarda ürünün verimi ve kalitesini düşüren yapışkanlık ve çökme gibi durumları önlemek amacıyla da kullanılmaktadır.

DONDURARAK KURUTMA

Liyofilizasyon olarak da adlandırılan dondurarak kurutma işlemi, dondurulacak gıdanın kurutma işleminden önce dondurulması ve ardından gıdadaki suyun düşük basınç altında doğrudan süblime edilmesine dayanan bir kurutma yöntemidir (Nireesha vd., 2013). Başarılı bir liyofilizasyon işlemi gerçekleştirmek için kurutma odasındaki basıncın en fazla 40 Pa mutlak basınçta tutulması gerekmektedir (Toledo, 2007). Düşük sıcaklık ve basıncın kombinasyonu şeklinde uygulanan bu işlem sayesinde renk ve lezzetin iyi derecede korunması sağlanırken kurutulmuş ürünün süngerimsi yapısı hızlı su penetrasyonuna ve rehidrasyon yoluyla tazeye yakın özelliklerin geri kazanılmasına olanak tanımaktadır (Ceballos vd., 2012).

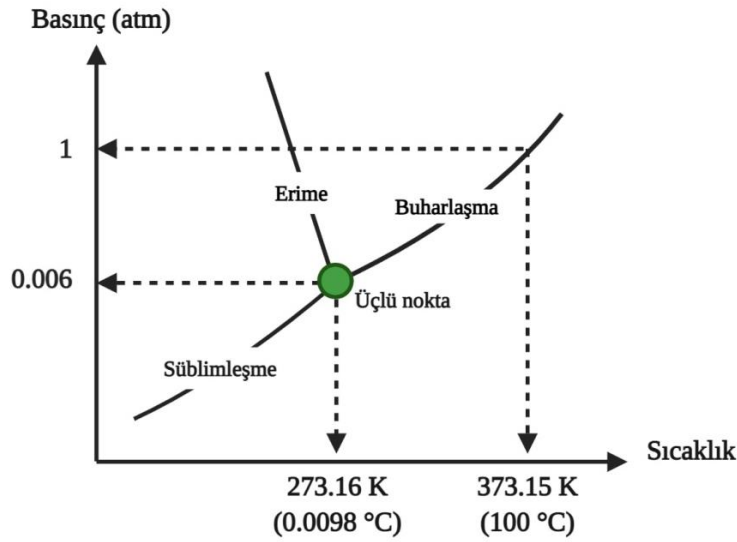
Günümüzde dondurarak kurutma, gıda maddeleri ve farmasötikler (aşı, protein, peptit, koloidal taşıyıcı vb.) dahil olmak üzere yüksek katma değerli ürünlerin kurutulması ve stabilitesinin artırılmasında önemli bir endüstriyel işlem haline gelmiştir (Kumar vd., 2011). Buna ek olarak, dondurarak kurutma işleminin gıda ürünlerinin kurutulmasında tercih edilmesinin en önemli sebepleri arasında raf ömrü uzun ve gelişmiş rehidrasyon özelliklerine sahip yüksek kaliteli

ürünler elde edilmesine olanak tanınması gösterilmektedir (Schössler vd., 2012). Gıdalar yapısında doğal olarak vitamin ve protein gibi ısıya duyarlı bileşenler içerdiğinden bu tür biyomateryallerin kurutulması termal ayrışma, oksidasyon veya enzimatik esmerleşmeye sebep olabilmektedir (Marques ve Freire, 2005). Bu nedenle bu ürünlerin kurutulması esnasında dondurarak kurutma gibi özel tekniklerin kullanımı ek avantajlar sağlamaktadır (Menon vd., 2020). Liyofilizasyon işlemi yüksek yatırım maliyeti ve enerji tüketimi nedeniyle özellikle katma değeri yüksek ürünlerin kurutulmasında kullanılmaktadır (Schössler vd., 2012). Dondurarak kurutma işlemi temel olarak (I) Malzemenin dondurulması, (II) Süblimleştirme ile dondurulmuş suyun uzaklaştırılması (birincil

kurutma) ve (III) Ürünün nem desorpsiyonunu teşvik etmek için daha fazla ısıtılması (ikincil kurutma) olmak üzere üç temel aşamadan oluşmaktadır (Searles vd., 2017).

Dondurma (Katılaştırma) Adımı

Ürünün dondurulması, dondurarak kurutma işleminin ilk adımıdır. Dondurma sırasında dondurulacak malzemeden elde edilen süspansiyon ilk olarak suyun faz diyagramında (Şekil 3) bulunan üçlü noktasının ($0.01\text{ }^{\circ}\text{C} = 273.16\text{ K}$) altındaki sıcaklığa soğutulmaktadır. Bu adımda serbest su olarak adlandırılan suyun büyük bir kısmı buz olarak kristalleşirken geri kalan kısım konsantre çözeltide bağlı su olarak bulunmaktadır (Pisano vd., 2011).



Şekil 3. Saf suyun faz diyagramı

Dondurma işlemi sırasında oluşan buz kristallerinin homojen dağılımı, etkili bir liyofilizasyon işleminin en önemli göstergelerindendir (Ratti, 2013). Dondurma koşullarının seçimi, dondurma işleminin verimliliğini optimize etmek ve örneklerin mikro yapısını korumak açısından büyük önem arz etmektedir (Delgado ve Rubiolo, 2005). İşlem koşulları aynı zamanda buz kristallerinin şekli ve

boyutunu, dolayısıyla kurutulmuş tabakadan buhar akışına karşı oluşan direnci belirlemede de etkilidir (Marques ve Freire, 2005). Örnek olarak, büyük buz kristalleri elde etmek ve böylelikle süblimleşme adımını kısaltmak için ürün özelliklerine bağlı olarak tavlama ve soğutma gibi işlemler uygulanarak donma hızı veya doğrudan çekirdeklenme sıcaklığı (buz kristallerinin çözelti içerisinde ilk olarak oluştuğu sıcaklık) kontrol

edilebilmektedir (Ratti, 2013). Düşük donma hızı hücrelerin aynı anda dehidrasyonunu ve harici sıvıların dondurulmasını sağlamakta, böylelikle büyük buz kristallerinin oluşumunu önleyerek süblimleşme aşamasında buhar akısını artırmaktadır. Hücrelere büyük miktarda çözünmüş madde geçişi ve su kaybı nedeniyle hücre zarlarında yırtılmalar meydana gelebilmektedir. Buna karşın, yüksek dondurma hızında oluşan küçük buz kristalleri hücre zarlarına hasar verilmemesini sağlamakta ancak süblimasyon sırasında su buharı akısı azaldığından kurutma için gereken süre artmaktadır (Cao vd., 2018). Kahve gibi bazı örneklerde gözenekli matris yapısında daha hızlı bir kurutma sağlanabildiğinden büyük buz kristalleri tercih edilmektedir. Çoğu gıda örneğinde ise büyük buz kristalleri hücre duvarlarına hasar vermekte ve rehidre edilmiş ürünün zayıf bir dokuya sahip olmasına neden olabilmektedir (Pisano vd., 2011).

Birincil Kurutma (Buz Süblimasyonu) ve İkincil Kurutma

Tipik bir liyofilizatör büyük bir valf vasıtasıyla bir kondenser odasına bağlanan sıcaklık kontrollü raflar içeren bir kurutma odasından oluşmaktadır. Kondenser haznesi ise çok düşük sıcaklıklarda (-50 °C'den düşük) muhafaza edilebilen bir dizi plaka veya bobin içermektedir (Pikal, 2002). Birincil kurutma aşaması dondurulmuş üründen buzun süblime edilmesini içermektedir. Bu işlemde öncelikle ısı, dondurulmuş çözeltiye tepsi ve flakon yoluyla aktarılarak süblimasyon cephesine iletilmektedir. Süblimleşen buz ve oluşan su buharı, ürünün kurutulmuş yüzeyinden kondensere aktarılmakta ve su buharı kondenser üzerinde yoğunlaşmaktadır. Süblimasyon adımının sonunda gözenekli bir yapı oluşmaktadır. Oluşan bu gözenekler, donmuş üründen buz kristallerinin kapladığı alanlara karşılık gelmektedir (Gaidhani vd., 2015). İkincil kurutma sırasında ise dondurulan üründen emilen suyun uzaklaştırılması işlemi gerçekleşmektedir. Bu aşamada uzaklaşan su, dondurma sırasında buz olarak ayrılmayan ve süblimleşmeyen suyu içermektedir (Kawasaki vd., 2019).

Dondurarak Kurutma İşleminin Avantajları, Dezavantajları ve Diğer Kurutma Yöntemleriyle Karşılaştırılması

Kurutma işleminin süresi ve sıcaklığı, kurutulmuş gıdaların kalitesini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Herhangi bir gıda ürünü için en iyi kurutma yöntemi hammadde özelliklerine, arzu edilen son ürün kalitesine ve ekonomik faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Moses vd., 2014). Dondurarak kurutma işleminde istenen dehidrasyon ve rehidrasyon oranlarını sağlayabilmek için soğutma hızının da optimize edilmesi gerekmektedir (Assegehegn vd., 2019). Dondurarak kurutma işlemi sırasında dikkate alınması gereken temel faktör, ürün kalitesini bozabileceğinden belirli sınırların altında kalması gereken ancak yavaş ve maliyetli bir işlemi önlemek için yeterince süblimasyon sağlayacak kadar da yüksek bir sıcaklık değerinin kullanılmasıdır. Dondurarak kurutma sırasında ürün sıcaklığı raf sıcaklığı ve hazne basıncının ayarlanması ile kontrol edilebilmektedir. Raf sıcaklığını sabit tutan hazne basıncındaki artış, süblimasyon verimini artırırken ürün sıcaklığını istenmeyen seviyelere yükseltebilmektedir. Süblimasyon oranını üründen fazla ısınmaya neden olmadan artırmak için bir diğer seçenek de raf sıcaklığındaki artışla birlikte ortam basıncını azaltmaktır (Ratti, 2013).

Her kurutma tekniğinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Dondurarak kurutma işlemi besinsel değerleri iyi derecede korunmuş, rehidrasyon, doku ve renk gibi parametrelerin taze ürüne yakın olduğu ürünler elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Voda vd., 2012). Bununla birlikte, dondurarak kurutma ürünlerin dondurulması, dondurulmuş numunelerin süblimasyonunu indüklemek için ısıtılması ve dehidrasyon odasının toplam basıncının düşürülmesi nedeniyle oldukça yüksek enerji gereksinimi olan bir işlemdir (Donsi vd., 2001). Dolayısıyla, günümüzde dondurarak kurutma işleminin gıda endüstrisinde kullanımı bazı meyve, sebze ve et ürünleri gibi yüksek katma değerli ürün grupları ile sınırlı durumdadır (Schössler vd., 2012). Dondurarak kurutma yöntemi, gıda işleminde geleneksel kurutma işlemlerinde uygulanan yüksek sıcaklık nedeniyle zarar görebilen organoleptik özellikleri korumak

veya depolama ve nakliye için daha uygun hale getirmek için kullanılabilir. İşlem çok düşük bir sıcaklıkta gerçekleştirildiği için dondurarak kurutulmuş gıdalarda taze ürünlere ait aroma ve doku korunmakta ve gözenekli yapı oluşmasına izin verilmektedir (Pisano vd., 2011). Diğer yandan bu arzu edilen ürün özelliklerini elde etmek için uzun işlem süreleri ve yüksek maliyetler gereklidir. Dondurarak kurutma işlemleri birkaç saatten birkaç güne kadar uzayabilen bir sürede gerçekleşmekte, bu durum da enerji maliyetini artırmaktadır (Schössler vd., 2012). Dondurarak kurutma işlemi ile toz ürünlerin besinsel ve aroma özellikleri diğer bazı kurutma yöntemlerine kıyasla daha iyi oranda korunabilse de uygulamanın yüksek maliyeti, bu teknolojinin endüstride kullanımını sınırlandırmaktadır (Duan vd., 2016). Aynı zamanda, kurutma raflarındaki yüzey sıcaklığının homojen olmaması aynı partideki ürün sıcaklıklarında farklılıklara neden olarak eşit kaliteye sahip ürün elde edilmesini zorlaştırabilmektedir (Fonte vd., 2016). Dondurarak kurutulmuş ürünler işlem sonunda öğütülerek toz haline getirilmelidir. Yüksek derecede higroskopik ürünler ortamdaki nemden etkilenme eğilimi göstereceğinden öğütme işlemi sırasında serbest akan bir toz elde etmek için olabildiğince kuru ortam şartlarının sağlanması gerekmektedir. Kurutulmuş örneğin %2-3'ten yüksek nem içeriğinin olması değirmenlerin tıkanmasına neden olabilmektedir (Barbosa-Cánovas vd., 2005).

Dondurarak kurutma, nihai toz ürünün kalitesi açısından çoğunlukla en iyi dehidrasyon yöntemi olarak kabul edildiğinden genellikle diğer kurutma yöntemlerinin performansını test etmek için referans olarak kullanılmaktadır. Özellikle gıda çözümlerinin püskürtmeli kurutucuda kurutulmasında, dondurarak kurutma ile karşılaştırmasının yapıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (Ratti, 2013). Püskürtmeli kurutma işlemi hızlı kurutma, yüksek verim ve sürekli çalışma gibi çeşitli avantajlar sağlayan bir kurutma yöntemidir (Ziaee vd., 2019). Püskürtmeli kurutulmuş ürünler toz, granül veya aglomerat formunda elde edilebilmektedir (Nindo ve Tang, 2007). Bununla birlikte püskürtmeli kurutma işlemi farklı partikül boyutu dağılımına sahip,

nispeten serbest akışlı ve muntazam küresel yapılı parçacıklar üretmeye imkân veren bir yöntemdir (Barbosa-Canovas vd., 2005). Buna karşın, ürün tipine bağlı olarak püskürtmeli kurutma işleminin dondurarak kurutmaya kıyasla renk ve aroma kaybı gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır.

PÜSKÜRTMELİ KURUTMA VE DONDURARAK KURUTMA YÖNTEMLERİ İLE GIDA ATIKLARINDAN ÖZÜTLENEN MADDELERİN TOZ FORMDA ÜRETİLMESİ

Gıda endüstrisinde tahılların, meyve ve sebzelerin, yağlık tohumların ve et ürünlerinin işlenmesi esnasında veya sonrasında içeriğinde kıymetli bileşenlerin de olduğu yan ürünler ve çoğu zaman da atıklar ortaya çıkmaktadır. Bu atıkların bünyesinde yer alan aktif maddelerin geri kazanımı sağlanarak hem ekonomik hem de çevresel katkı sağlanmaktadır. Meyve ve sebzelerin posaları ve çekirdekleri, tahılların kabukları ve kepekleri, yağlık tohumların küspeleri ve balık işleme atıkları aktif biyolojik maddeleri önemli miktarda içermektedir (Oreopoulou ve Tzia, 2007). Bu maddeler arasında yer alan polifenollerin, renk maddelerinin, prebiyotik liflerin, hidrokolloidlerin, yağ asitlerinin ve biyoaktif peptitlerin hem insan sağlığına hem de teknolojik olarak yeni ürünlerin formülasyonlarında faydalı etkileri olduğu vurgulanmaktadır (Herrero vd., 2015). Gıda atıklarından ve/veya yan ürünlerinden bu maddelerin geri kazanımında uygulanan en temel işlem özütlemedir (ekstraksiyon). Atık matriksi ve bu matrikste yer alan hedef bileşenin kimyasal niteliğine göre uygun çözücü ve yöntem ile yüksek verimlilikte geri kazanımının sağlanması birincil hedefdir (Luque ve Clark, 2013). Özütlemenin ardından genellikle çözücünün uzaklaştırılması (süperkritik akışkan özütleme hariç) sağlanmakta ve konsantre özüt uygun ambalaj materyalinde tıp, eczacılık, gıda, kozmetik, vb. alanlarda kullanılmak üzere tüketiciye veya ara sektörlere arz edilmektedir (Herrero vd., 2015). Bu özütlerin daha yüksek raf ömrü ve stabiliteye sahip olması ile formülasyonlarda kullanımının kolay olması arzulanıdığından toz forma dönüştürülmesi özellikle son yıllarda ele alınan başlı başına bir

konu olmuştur. Bu amaçla gıda atıklarından üretilen özütler, püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemleri ile toz forma dönüştürülmektedir. Her iki yöntemin temelini ve son toz ürünündeki genel etkilerine yukarıda detaylı değinilmesine rağmen, özütlerin polar – apolar özellikleri ile hidrofilik – hidrofobik niteliklerine göre bu yöntemlerden ne şekilde etkilenecekleri çoğu zaman öngörülemezdir (Yerlikaya ve Şen Arslan, 2019). Bu yüzden bu konuda gerçekleştirilen çalışmalarda her iki yöntemin bir arada ele alındığı ve karşılaştırma şeklinde toz ürünün fiziksel özellikleri ile diğer kimyasal ve biyokimyasal özelliklerinin sunulduğu görülmektedir (Chronakis vd., 2004). Dondurarak kurutma yöntemi; kurulum maliyeti, işlem süresi & maliyeti ve işlem hacmi açısından dezavantajlı gösterilmesine rağmen ısıya duyarlı (thermolabile) bileşenlerin özellikle ilaç sanayisinde kullanılmak üzere en yüksek oranda korunumunun sağlanmasında tercih edilmektedir (Ratti, 2013). Püskürtmeli kurutma yöntemi, özütlerden toz ürün veya toz mikrokapsül üretiminde teknolojik olarak daha çok tercih edilmektedir (Vidović vd., 2014). Çalışmalarda, püskürtmeli kurutma işlem parametrelerinin

optimizasyonunun son ürün özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilmesinin önemine dikkat çekilmektedir. Optimizasyonun ele alınmadığı çalışmalarda dondurarak kurutma yöntemi ile kıyaslanmanın sağlıklı olmayacağı bir gerçektir. Zira püskürtmeli kurutma işleminde hava giriş sıcaklığı ve atomizasyon basıncı gibi değişkenlerin farklılaşmasıyla verim, akabilirlik ve higroskopik özellikler oldukça etkilenebilmektedir (Muzaffer ve Kumar, 2015). Dolayısıyla optimizasyonun ele alınmadığı çalışmalarda son toz ürün özelliklerinin bu yöntemlerden doğrudan ne derece etkilendiği ile ilgili somut yorumlar yapmak güçtür. Gıda atıklarından elde edilen hedef maddelerin biyokimyasal özellikleri göz önüne alınarak bir kurutma yönteminin seçimi toz ürün üretimi için büyük önem arz etmektedir. Kalite açısından, ürün mikroyapısının ve fonksiyonel bileşiklerin dehidrasyon (kurutma) yönteminin bir fonksiyonu olarak karşılaştırılmasına da son zamanlarda eğilim artmaktadır. Bu bağlamda gıda atıklarından hem püskürtmeli hem de dondurarak kurutma ile üretilen bileşiklerin son ürün özelliklerini değerlendiren karşılaştırmalı bazı çalışmalar Çizelge 1’de özet halinde sunulmuştur.

Çizelge 1. Gıda işleme sonucu oluşan atık ve/veya yan ürünlerden farklı materyallerin püskürtmeli ve dondurarak kurutma yöntemleri ile geri kazanımı için yapılmış bazı çalışmalar

Hammadde	Hedef bileşik/ürün	Püskürtmeli kurutma	Dondurarak kurutma	Ortak özellikler/faydalar	Kaynak
Üzüm kabuğu	Antosiyanin	Toz mikrokapsüller daha düşük ortalama çap (0.56 µm) ve daha yüksek antosiyanin kapsülleme verimi (~%75); karanlıkta depolama sırasında ise en düşük bozunma sabiti (0.0207 1/sa) ve en uzun yarılanma ömrüne (33.47 sa) sahiptir. Püskürtülerek kurutulmuş mikrokapsüller tüm analizlerde en yüksek stabiliteye sahiptir.	Dondurarak kurutulmuş örnekler ortalama çap (~100 µm), antosiyanin kapsülleme verimi (~%71), bozunma sabiti (0.0255 1/sa) ve yarılanma ömrü (27.14 sa) açısından püskürtmeli kurutmaya kıyasla daha düşük stabilite sağlamıştır.		Zang vd. (2020)
Siyah pirinç kepeği (<i>Oryza sativa</i> L.)	Antosiyanin	Hava giriş sıcaklığındaki artışla birlikte yığın yoğunluğu ve antosiyanin tutulmasında azalma meydana gelirken işleme verimliliği, çözünürlük, dağılılabirlik, akabilirlik ve parçacık yüzeyindeki pürüzlülükte artış gözlenmiştir.	Dondurularak kurutulmuş antosiyanin tozları yığın yoğunluğu, işlem verimliliği ve antosiyanin hapsedilmesi açısından daha üstün nitelik sağlamıştır.	Kıvrılmış siyah pirinç unundan elde edilen maltodekstrin kullanımı, her iki kurutma yönteminde de antosiyanin tozu üretiminde yüksek verimlilik sağlamıştır.	Laokuldikok ve Kanhaa (2015)

Çizelge 1. devam

Hammadde	Hedef bileşik/ürün	Püskürtmeli kurutma	Dondurarak kurutma	Ortak özellikler/faydalar	Kaynak
Yıldız meyvesi (<i>Averrhoa carambola</i>) posası	Fenolik bileşikler	Toz ürün daha yüksek "L" değerine ve higroskopik özelliğe sahiptir. Kaplama materyalinde maltodekstrin konsantrasyonunun artmasıyla kapsüllerin higroskopikliğinde azalma gözlenmiştir. Kurutulmuş mikrokapsüllerin bazıları küresel şekildedeyken bazıları düz görünümüne sahiptir.	En yüksek mikroenkapsülasyon verimliliği elde edilmiştir. Öğütme sırasında tozlar, serbest akış özelliği gösteren amorf ve camsı bir yapıda görünmüştür. Maltodekstrin ile kaplanan örneklerin parçacık boyutunda küçülme ve kapsüllerde daha keskin kenarlı yapılar meydana gelmiştir.	Özütleme işlemine ait optimize edilmiş model koşullarında (40 °C işlem sıcaklığı ve %65 etanol konsantrasyonu) üretilen yıldız meyvesi posası polifenol mikroenkapsüllerinin, farklı gıda sistemlerinde antioksidan özellikleri artırmak amacıyla kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.	Saikia vd. (2015)
Üzüm (<i>Vitis labrusca</i> var. Bordo) kabuğu	Fenolik bileşikler	Örnekler daha düşük nem, a_w ve parçacık boyutuna, daha yüksek çözünürlüğe sahiptir. Mikropartiküller daha yüksek camsı geçiş sıcaklığı değerine sahip olmuştur. Parçacıklar küresel bir şekle sahiptir. En iyi kapülleme %5 kısmi hidrolize guar gam ve %5 polidekstroz ile sağlanmıştır.	Parçacıklar düzensiz yapılar ve daha az higroskopik özellik sergilemiştir.		Kuck ve Noreña (2016)
Avokado kabuğu	Antioksidan bileşikler	Nisin ve antioksidan avokado kabuğu özütü karışımı koaservasyon yöntemiyle başarıyla kapsüllenmiştir. Emülsiyon haline getirilmiş kompleksler sayesinde daha yüksek mikroenkapsülasyon verimi elde edilmiştir.	Emülsiyon haline getirilmiş kompleksler ile daha yüksek su aktivitesi ve nem değeri elde edilmiştir.		Calderón-Oliver vd. (2017)
Aşısız yaban mersini posası	Polifenol-protein kompleksleri	Soya proteini izolatu ile üretilen örnekler en yüksek polifenol konsantrasyonu (156.2 mg GAE/g), antosiyanin konsantrasyonu (13.4 mg/g) ve DPPH antioksidan kapasitesine (714.1 µmol TE/g) sahiptir. Protein ile kompleks haline getirilmiş yaban mersini polifenoller, 4 °C ve 20 °C'de 16 hafta boyunca bozunmaya karşı korunabilmiştir.	En düşük su aktivitesi değeri nohut unu ile üretilen örnekler aittir.	Toplam fenolik ve antosiyanin içerikleri benzer sonuçlar sağlamıştır.	Correia vd. (2017)
Kahve telvesi	Fenolik bileşikler	İkinci en yüksek fenolik içerik 1:1 (<i>w/w</i>) oranında maltodekstrin ve gam arabik karışımı ile kapsüllenmiş örneklerden elde edilmiştir.	En iyi sonuçlar, fenolik bileşiklerin maltodekstrin ile kapsüllenmesi sonucu (%62) elde edilmiş ve flavonoid geri kazanım oranı %73 olarak belirlenmiştir. Kurutma öncesinde belirlenen antioksidan kapasitenin %73-86'sı korunmuştur.		Ballesteros vd. (2017)
Böğürtlen (<i>Rubus fruticosus</i>) atıkları	Antosiyanin ve antioksidan bileşikler	Elde edilen parçacıklar küresel bir mikroyapı sergilemiştir.	Elde edilen parçacıklar düzensiz aglomeratlar oluşturmuştur.	Her iki yöntemle de örneklerde yüksek antosiyanin verimi (%76'nın üzerinde) ve yüksek antioksidan kapasite (1001 µmol TE/g) elde edilmiştir. Kullanılan kaplama materyali (polivinilpropilen) antosiyaninleri hapsedmede etkili olmuştur.	Machado vd. (2018)

Çizelge 1. devam

Hammadde	Hedef bileşik/ürün	Püskürtmeli kurutma	Dondurarak kurutma	Ortak özellikler/faydalar	Kaynak
Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.) meyvesi posası	Biyoaktif bileşikler	Toz örnekler daha düşük nem içeriği, a_w , higroskopik özellik, parçacık boyutu ve yüksek çözünürlüğe sahip olmuştur. Karotenoid, asetik asit ve fenolik maddeler açısından daha düşük mikroenkapsülasyon verimliliği elde edilmiştir. Genel olarak, daha yüksek biyoaktif bileşik konsantrasyonu (asetik asit hariç) ve daha yüksek antioksidan aktivite sağlanmıştır.	Toz üründe mikroenkapsülasyon etkinliği daha yüksektir (%78-97). Kurutulmuş ürünler düzensiz morfolojik yapıya sahip olmuştur.	Acerola atığı özütleri acerola özütlerine göre daha yüksek biyoaktif bileşik konsantrasyonuna (asetik asit hariç) ve daha düşük antioksidan aktiviteye sahiptir.	Rezende vd. (2018)
Limon atığı	Fenolik bileşikler ve flavonoid	Farklı kaplama materyalleri kullanılmış ve kaplama materyallerinden bağımsız olarak farklı boyutlarda küresel parçacıklar oluşmuştur.	Maltodekstrin ve soya fasulyesi proteini karışımı ile kapsüllenen tozlar en yüksek fenolik (1.66 mg GAE/g kb) ve flavonoid (0.43 mg KE/g kb) miktarına, düşük nem içeriği ve a_w değerine sahip olmuştur.	X ışını kırınımı analizi sonucu, her iki teknikte üretilen örneklerde de düşük kristallik derecesi belirlenmiştir.	Papoutsis vd. (2018)
Gül atığı	Antosiyenin	Toz örnekler küresel bir yapı sergilemiş ve gül antosiyenin özütlerine benzer niteliklerde, arzu edilir renk özellikleri sergilemiştir.	Tozlar daha homojen dağılımlı ve katmanlı bir yapıya sahiptir. Daha yüksek fenolik (%91.44) ve antosiyenin (%95.12) tutunması tespit edilmiştir. Depolama süresince daha yüksek antosiyenin stabilitesi bulgulanmıştır.	Her iki kurutma işlemi de gül atıkları için etkili bir koruma sağlamıştır. Gül atığından elde edilen örnekler gül antosiyenin özütlerine kıyasla daha düşük nem içeriği, a_w değeri ve önemli ölçüde daha yüksek çözünürlüğe sahiptir.	Yu ve Lv (2019)
Üzüm posası	Biyoaktif bileşikler	Peyniraltı suyu ve gam arabik karışımı ile fenolik bileşikler en üst düzeyde (2.66 mg/g GAE) tutunmuş ve en yüksek DPPH antioksidan kapasite değeri (12.64 μ mol/g TE) sağlanmıştır.	Peynir altı suyu ve gam arabik karışımı ile kaplanan tozlar daha yüksek toplam monomerik antosiyenin (0.35 mg/g malvidin-3,5-diglikozit eşdeğeri) ve antioksidan kapasite (8.32 μ mol/g TE) sağlamıştır.	Peynir altı suyu ve gam arabik karışımı ile kaplanan tozlar simüle bağırsak ortamında antosiyeninlerin daha yüksek oranda salınımını sağlamıştır.	Rocha ve Noreña (2020)

a_w : Su aktivitesi; KE: Kateşin eşdeğeri; DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; GAE: Gallik asit eşdeğeri; kb: Kuru bazda; TE: Troloks eşdeğeri.

Gıda maddelerinin kurutulması karmaşık bir işlemdir çünkü kurutma esnasında tozun fizikokimyasal özelliklerini etkileyen fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal dönüşümler meydana gelebilmektedir. Bu nedenle kurutucu işlem koşulları besleme miktarına, üretilen ürüne, kurutmanın amacına ve kullanılan yöntemlere göre belirlenmelidir (Shishir ve Chen, 2017). Örneğin daha yüksek hava giriş/kurutma sıcaklığı, toz verimi ile kurutma hızının artmasını sağlamaktadır. Kurutma hızı aynı zamanda toz ürüne ait kütle yoğunluğu, nem içeriği, renk, parçacık boyutu, besin bileşenleri içeriği ve ıslanabilirlik özelliklerini etkilemektedir (Cai ve

Corke, 2000, Fazaeli vd., 2012). Bu bağlamda Laokuldilok ve Kanhaa (2015) siyah pirinç kepeğinden antosiyenin eldesinde hava giriş sıcaklığındaki artışla birlikte yığın yoğunluğu ve antosiyenin tutulmasında azalma, işlem verimliliği, çözünürlük, dağılılırlik, akabilirlik özelliklerinde ise artış gözlemlenmiştir. Salem vd. (2020) ise püskürtmeli kurutmanın köpekbalığı derisinden elde edilen jelatin tozlarının köpük ve emülsiyon özellikleri ile yağ bağlama ve su tutma kapasitelerini geliştirdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, bazı araştırmacılar püskürtmeli kurutma işlemi ile daha düşük nem içeriği, higroskopik özellik ve su aktivite değeri (Kuck ve

Noreña, 2016; Rezende vd., 2018) tespit ederken dondurarak kurutma işlemi ile daha düşük nem ve su aktivitesi değeri bildiren çalışmalar da mevcuttur (Papoutsis vd., 2018).

Gıda ürünlerinin kompleks yapısı ve özelliklerinin çeşitliliği nedeniyle tek bir kurutma tekniği, nihai ürünün kalite gereksinimlerini karşılamak için yetersiz kalabilmektedir. Örneğin, püskürtmeli kurutmanın termal bir işleme dayanıyor olması ve parçacıkların oksijen ile temas etmesi, sıcaklığa ve oksidasyona karşı duyarlı bileşikler için dezavantaj oluşturabilmektedir (Ratti, 2013). Diğer yandan, dondurarak kurutma teknolojisinin vakum altında ve düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesinin sıcaklığa duyarlı malzemelerin renk, aroma ve besin değerlerini yüksek oranda koruyabildiğini ifade eden çalışmalar mevcuttur (Ratti, 2001; Sun vd., 2019). Buna karşın Arsa ve Theerakulkait (2018), pirinç kepeğinden püskürtmeli ve dondurarak kurutma yöntemlerinin aroma bileşikleri üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında püskürtmeli kurutma işlemi ile elde edilen üründe daha yüksek oranlarda arzu edilen aroma bileşikleri tespit etmişlerdir. Machado vd. (2018) ise hem püskürtmeli hem de dondurarak kurutma yöntemleri ile böğürtlen atıklarından elde edilen antosiyanin örneklerinin yüksek antosiyanin verimi ve antioksidan kapasite gösterdiğini bildirmişlerdir. Gıda bileşenlerini veya hücrelerini neme, ısıya veya oksijene karşı korumak, uçuculuğu yüksek oranda önlemek ve aromayı muhafaza etmek amacıyla kurutma parametrelerinin kontrolünün yanında mikroenkapsülasyon gibi teknolojilerden de yaygın olarak faydalanılmaktadır (Fang ve Bhandari, 2011). Bu nedenle, çalışma sonuçlarında oluşan farklılıklar kullanılan kaplama materyalleri ile de ilişkilendirilebilir. Çizelge 1'deki bulgular incelendiğinde, farklı bileşenlerin mikroenkapsülasyona tabi tutulduğu işlemlerde fenolik bileşiklerin kapsüllenme verimi açısından dondurarak kurutma yönteminin daha etkili olduğu çalışmalar (Saikia vd., 2015; Ballesteros vd., 2017; Papoutsis vd., 2018) mevcutken püskürtmeli kurutma ile daha yüksek kapsülleme verimi elde edilen çalışmalar da (Rocha ve Noreña, 2020) mevcuttur. Bununla birlikte antosiyaninin kapsüllenme verimliliği için yine her

iki kurutma yönteminin de avantajlı olduğu sonuçlar elde edilmiştir. Bu bağlamda Zang vd. (2020) püskürtmeli kurutma işlemi daha etkin olarak ifade ederken Murali vd. (2014) ve Laokuldilok ve Kanhaa (2015) ise dondurarak kurutma işleminde daha yüksek kapsüllenme verimi elde etmişlerdir. Tüm bu çalışmalardan yola çıkılarak mikroenkapsülasyon işlemi için kullanılan kaplama materyalinin hammaddeye, hedef bileşiklere ve kurutma yöntemine uygunluğu da önem arz etmektedir. Ek olarak kurutma işlemlerinin elde edilen toz ürünlerin mikroyapısını etkilediği de bilinmektedir. Püskürtmeli kurutma işleminde ürün damlacık formunda kurutulduğundan doğal olarak küresel partiküller elde edilmektedir. Buna karşın, dondurarak kurutulan örnekler ek bir öğütme işlemine tabi tutulduklarından küresel bir yapıya sahip değildirlere. Genel olarak Çizelge 1'de yer alan literatür çalışmalarında da bu durumu destekler nitelikte püskürtmeli kurutma ile elde edilen tozların daha küresel bir mikroyapı gösterdiği, dondurarak kurutulmuş örneklerde ise daha keskin kenarlı ve düzensiz parçacıklar elde edildiği rapor edilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Püskürtmeli kurutma, nihai ürünün partikül boyutu ve dağılımı, nem içeriği, yığın yoğunluğu ve morfoloji gibi özelliklerinde daha iyi kalitede tozlar üretmesi nedeniyle en çok tercih edilen kurutma yöntemlerinin başında gelmektedir. Püskürtmeli kurutmanın yüksek kalitede toz ürün sağlamasının yanında dondurarak kurutmaya kıyasla daha düşük enerji ihtiyacı ve sürekli çalışabilmesi, sağladığı diğer avantajları arasında öne çıkmaktadır. Buna karşın, yöntemin termal işleme dayanması, parçacıkların oksijen ile teması gibi durumlar bu yöntemin dış etkenlere karşı duyarlı gıda bileşenlerinin (protein, fenolik bileşikler, vitaminler, renk maddeleri vb.) bozulma veya kayıplarına neden olabilmektedir. Bu durumda düşük sıcaklıklarda ve vakum altında çalışmaya izin veren dondurarak kurutma yöntemi öne çıkmakta ve böylece sıcaklığa ve oksijene duyarlı bileşiklerin yüksek oranda korunumu sağlanabilmektedir. Kurulum maliyeti ve uzun işlem süresi ise dondurarak kurutma yönteminin en önemli dezavantajlarıdır. Buna ek olarak işlem

sonunda ek bir öğütme işlemi gerektiriyor olması dondurarak kurutma işleminin kullanımını sınırlamaktadır. Buna karşın her iki kurutma tekniğinin oluşturabileceği olumsuzlukların önüne geçebilmek için mikrokapsülasyon işlemi uygulanmaktadır. Bu sayede istenmeyen fiziksel değişikliklere (yapışma, kabuk bağlama, topaklanma vb.) neden olabilecek durumların yanında, kimyasal özelliklerdeki değişimlerin de önüne geçilebilmektedir. Bu noktada hammaddenin fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri ile kurutma işlemlerinin son ürünün kalite özellikleri üzerindeki etkileri de göz önüne alınarak kullanılacak kurutma yöntemine karar verilmesi önem kazanmaktadır.

Günümüzde tüketicilerin kaliteli, güvenilir, ilave sentetik katkı maddesi veya koruyucu madde içermeyen sağlıklı ve fonksiyonel gıdalara artan talebini karşılamak için ilgili sektörler çeşitli çalışmalar yapmaktadır. Bu noktada gıda atıklarından özütleme işlemleri sonucu elde edilen fonksiyonel bileşiklerden üretilen tozların önemi ortaya çıkmakta ve bu ürünlere olan taleplerin gelecek yıllarda daha da artacağı tahmin edilmektedir. Bu derleme makale kapsamında potansiyel fonksiyonel bileşik kaynağı olan gıda atıklarının püskürtmeli ve dondurarak kurutma teknikleri ile geri kazanımı, kurutucu sistem mekanizmaları ve uygulamaları tartışılmıştır. Mevcut çalışmanın gıda işleme ve atık değerlendirme konularında çalışan profesyoneller ve araştırmacılar için yol gösterici bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

Tüm yazarlar yayının planlanması ve yazımında eşit oranda katkı sağlamışlardır.

TEŞEKKÜR

Yazarlar olarak, *Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu*'na (TÜBİTAK; Proje no: 217O066) teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

Adhikari, B. Howes, T., Bhandari, B. R., Troung, V. (2003). Surface stickiness of drops of carbohydrate and organic acid solutions during convective drying: Experiments and modelling. *Dry Technol*, 21(5): 839-873, <https://doi.org/10.1081/DRT-120021689>.

Arsa, S., Theerakulkait, C. (2018). Preparation, aroma characteristics and volatile compounds of flavorings from enzymatic hydrolyzed rice bran protein concentrate. *J Food Sci Agric*, 98(12): 4479-4487; <https://doi.org/10.1002/jsfa.8972>.

Arshadi, M., Attard, T. M., Lukasik, R. M., Brnčić, M., Da Costa Lopes, A. M., Finell, m. et al. (2016). Pre-treatment and extraction techniques for recovery of added value compounds from wastes throughout the agri-food chain. *Green Chem*, 18(23): 6160-6204, <https://doi.org/10.1039/C6GC01389A>.

Assegehegn, G., Brito-de la Fuente, E., Franco, J. M., Gallegos, C. (2019). The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance. *J Pharm Sci*, 108(4): 1378-1395, <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>.

Ayadi, M. A., Khemakhem, M., Belgith, H., Attia, H. (2008). Effect of moderate spray drying conditions on functionality of dried egg white and whole egg. *J Food Sci*, 73: E281-E287, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00811.x>.

Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chem*, 237: 623-631, [https://doi.org/10.1016/j.foodchem.\(2017\).05.142](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.(2017).05.142).

Barbosa-Cánovas, G. V., Juliano, P. (2005). Physical and chemical properties of food powders. *Encapsulated and Powdered Foods*, 39 – 71.

Bataglion, G. A., Da Silva, F. M. A., Eberlin, M. N., Koolen H. H. F. (2015). Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. *Food Chem*, 180: 280-

- 287, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.059>.
- Bhandari, B. (2013). Introduction to food powders, Handbook of food powders (Bhandari, B., chief ed.), Woodhead Publishing, Sawston, p 688.
- Botrel, D. A., Barros Fernandes, R. V. D., Borges, S. V., Yoshida, M. I. (2014). Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Res Int*, 62: 344-352, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.003>.
- Burgain, J., Petit, J., Scher, J., Rasch, R., Bhandari, B., Gaiani, C. (2017). Surface chemistry and microscopy of food powders, *Prog Surf Sci*, 92(4): 409-429, <https://doi.org/10.1016/j.progsurf.2017.07.002>.
- Cai, Y., ve Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried amaranthus betacyanin pigments. *J Food Sci*, 65: 1248e1252, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>.
- Cal, K., ve Sollohub, K. (2010). Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *J Pharm Sci*, 99: 575e586, <https://doi.org/10.1002/jps.21886>.
- Cao, X., Zhang, F., Zhao, D., Zhu, D., Li, J. (2018). Effects of freezing conditions on quality changes in blueberries. *J Sci Food Agric*, 98(12): 4673-4679, <https://doi.org/10.1002/jsfa.9000>.
- Calderón-Oliver, M., Pedroza-Islas, R., Escalona-Buendía, H. B., Pedraza-Chaverri, J., Ponce-Alquicira, E. (2017). Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract. *Food Hydrocoll*, 62: 49-57, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.028>.
- Can Karaca, A., Guzel, O., Ak, M. M. (2016). Effects of processing conditions and formulation on spray drying of sour cherry juice concentrate. *J Sci Food Agric*, 96: 449e455, <https://doi.org/10.1002/jsfa.7110>.
- Caparino, O. A., Tang, J., Nindo, C. I., Sablani, S. S., Powers, J. R., ve Fellman, J. K. (2012). Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine “Carabao” var.) powder. *J Food Eng*, 111: 135e148, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.010>.
- Ceballos, A. M., Giraldo, G. I., Orrego, C. E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *J Food Eng*, 111(2): 360-365, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.010>.
- Champagne, C. P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr Opin Biotechnol* 18: 184-190, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>.
- Chan, S. Y., Choo, W. S. (2013). Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chem*, 141(4): 3752-3758, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.097>.
- Chegini, G. R., Ghobadian, B. (2005). Effect of Spray-Drying Conditions on Physical Properties of Orange Juice Powder. *Dry Technol*, 23: 657-668, <https://doi.org/10.1081/DRT-200054161>.
- Chegini, G. R., Khazaei, J., Ghobadian, B., Goudarzi, A. M. (2008). Prediction of process and product parameters in an orange juice spray dryer using artificial neural networks. *J. Food Eng*. 84(4): 534-543, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.06.007>.
- Chen, M. L., Ning, P., Jiao, Y., Xu, Z., & Cheng, Y. H. (2021). Extraction of antioxidant peptides from rice dreg protein hydrolysate via an angling method. *Food Chemistry*, 337: 128069, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128069>.
- Chindapan, N., Niamnuy, C., Devahastin, S. (2018). Physical properties, morphology and saltiness of salt particles as affected by spray drying conditions and potassium chloride substitution. *Powder Technol.*, 326, 265-271, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.12.014>.
- Chronakis, I. S., Triantafyllou, A. Ö., Öste, R. (2004). Solid-state characteristics and redispersible properties of powders formed by spray-drying and freeze-drying cereal dispersions

- of varying (1 → 3, 1 → 4)- β-glucan content. *J Cereal Sci*, 40: 183-193, <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2004.03.004>.
- Chuah, L., Rashih, (2012). Optimization of spray drying process parameters of Piper betle L. (Sirih) leaves extract coated with maltodextrin. *J Chem Pharm*, 4(3): 1833-1841. 4, ID: 8315610.
- Correia, R., Grace, M. H., Esposito, D., Lila, M. A. (2017). Wild blueberry polyphenol-protein food ingredients produced by three drying methods: Comparative physico-chemical properties, phytochemical content, and stability during storage. *Food Chem*, 340: 553-562, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.063>.
- Cuq, B., Rondet, E., Abecassis, J. (2011). Food powders engineering, between knowhow and science: Constraints, stakes and opportunities, *Powder Technol*, 208(2): 244-251, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.08.012>.
- Dalmoro, A., Barba, A. A., Lamberti, G., d'Amore, M. (2012). Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. *Eur J Pharm Biopharm*, 80: 471e477, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.01.006>.
- De Leonardis, A., Macciola, V., Iorizzo, M., Lombardi, S. J., Lopez, F., & Marconi, E. (2018). Effective assay for olive vinegar production from olive oil mill wastewaters. *Food chemistry*, 240, 437-440, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.159>.
- Delgado, A. E., Rubiolo, A. C. (2005). Microstructural changes in strawberry after freezing and thawing processes. *Lebensmittel-Wiss. U.-Technol*, 38(2): 135-142, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.015>.
- Dhanalakshmi, K. Ghosal, S., Bhattacharya, S. (2011). Agglomeration of Food Powder and Applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51(5) : 432-441; DOI: 10.1080/10408391003646270.
- Donsì, G., Ferrari, G., Matteo, D. I. (2001). Utilization of combined processes in freeze-drying of shrimps. *Food Bioprod Process*, 79(3): 152-159, DOI: 10.1205/096030801750425244.
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., Kostić, I., Komes, D., Bugarski, B., Nedović, V. (2015). Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. *Food Eng Rev*, 7: 452-490, <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>.
- Duan, X., Yang, X., Ren, G., Pang, Y., Liu, L., Liu, Y. (2016). Technical aspects in freeze-drying of foods. *Dry Tech*, 34(11): 1271-1285, <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1099545>.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović-Uzelac, V. (2016). Optimization of sour cherry juice spray drying as affected by carrier material and temperature. *Food Technol Biotech*, 54(4), 441-449.
- Ermiş, E., Karasu, E. N. (2020). Spray drying of de-oiled sunflower protein extracts: functional properties and characterization of the powder. *Gıda: J Food*, 45 (1): 39-49, DOI: 10.15237/gıda.GD19096.
- Fang, Z. X., Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyhenols. *Food Chem*, 129: 1139-1147, DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.05.093.
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food Bioprod Process*, 90: 667e675, <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.006>.
- Fonte, P., Reis, S., Sarmento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release*, 225: 75-86, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.034>.
- Gaidhani, K. A., Harwalkar, M., Bhambere, D., Nirgude, P. S. (2015). Lyophilization/freeze drying—a review. *World J Pharm Res*, 4(8): 516-543.
- Galanakis, C. M., Tornberg, E., Gekas, V. (2010). Clarification of high-added value products from olive mill wastewater. *J Food Eng*, 99: 190-197, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.018>.

- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voille, A. and Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients. *Food Res Int*, 40(9): 1107-1121, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>.
- Goula, A. M., Adamopoulos, K. G. (2010). A new technique for spray drying orange juice concentrate. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 11(2): 342-351, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.12.001>.
- Goula, A. M., Adamopoulos, K. G. (2003). Spray drying performance of a laboratory spray dryer for tomato powder preparation. *Dry Technol*, 21(7):1273-1289, DOI: 10.1081/DRT-120023180.
- Goula, A. M., Adamopoulos, K. G., Kazakis, N. A. (2004). Influence of spray drying conditions on tomato powder properties. *Dry Technol*, 22(5): 1129-1151, DOI: 10.1081/DRT-120038584.
- Goula, A. M. (2017). Implications of non-equilibrium state glass transitions in spray-dried sugar-rich foods. In *Non-Equilibrium States and Glass Transitions in Foods*, Woodhead Publishing, Sawston, (Bhandari, B., chief ed.), pp. 253-282.
- Gu, M., Fang, H., Gao, Y., Su, T., Niu, Y., Yu, L. (2020). Characterization of enzymatic modified soluble dietary fiber from tomato peels with high release of lycopene. *Food Hydrocoll*, 99: 105321, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105321>.
- Haggag, Y. A., Faheem, A. M. (2015). Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. *Front Pharmacol*, 6, 140.
- Haque, M. A., Timilsena, Y. P., Adhikari, B. (2015). *Spray drying. Drying Technologies for Foods: Fundamentals ve Applications* New India Publishing Agency, India, (Nema, P. K., chief ed.), pp.79-106.
- Hashtjin, A. M., Abbasi, S. (2015). Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. *Food Hydrocoll*, 44: 40-48, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.08.017>.
- Herrero M., Sánchez-Camargo, A. P., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2015). Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends Analyt Chem*, 71: 26-38, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>.
- Hua, M., Lu, J., Qu, D., Liu, C., Zhang, L., Li, S., Chen, J., Sun, Y. (2019). Structure, physicochemical properties and adsorption function of insoluble dietary fiber from ginseng residue: A potential functional ingredient. *Food Chem*, 286: 522-529, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.114>.
- Intipunya, P., Bhandari, B. R. (2010). Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. *Handbook on Spray Drying Applications for Food Industries*, Woodhead Publishing, , Sawston, (Skibsted, L., chief ed.), pp.663-700.
- Jafari, S. M., Ghalenoei, M. G., Dehnad, D. (2017). Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technol*, 311: 59-65, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.01.070>.
- Kalogeropoulos, N., Chiou, A., Pyriochou, V., Peristeraki, A., Karathanos, V. T. (2012). Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT - Food Sci Technol*, 49(2): 213-216, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.12.036>.
- Kawasaki, H., Shimanouchi, T., Kimura, Y. (2019). Recent development of optimization of lyophilization process. *J Chem*, 2019, <https://doi.org/10.1155/2019/9502856>.
- Keshani, S., Daud, W. R. W., Nourouzi, M. M., Namvar, F., Ghasemi, M. (2015). Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *J Food Eng*, 146: 152-162, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.004>.
- Kuck, L. S., Noreña, C. P. Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food Chem*, 194: 569-576.

- [https://doi.org/10.1016/j.foodchem.\(2015\).08.066](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.(2015).08.066).
- Kumar, G., Prashanth, N., Kumari, B. (2011). Fundamentals and applications of lyophilization. *J Adv Pharm Res*, 2(4): 157-169.
- Laokuldilok, T., Kanha, N. (2015). Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying. *LWT - Food Sci Technol*, 64(1): 405-411. [https://doi.org/10.1016/j.lwt.\(2015\).05.015](https://doi.org/10.1016/j.lwt.(2015).05.015).
- León-Martínez, F. M., Méndez-Lagunas, L. L., Rodríguez-Ramírez, J. (2010). Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydr Polym*, 81(4): 864-870, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.061>.
- Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., Koutinas, A. A., Kopsahelis, N., Stamatelatos, K., Dickson, F., et al. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy Environ Sci*, 6, 426-464, <https://doi.org/10.1039/C2EE23440H>.
- Looi, Y. F., Ong, S. P., Julkifle, A., Alias, M. S. (2019). Effects of pretreatment and spray drying on the physicochemical properties and probiotics viability of Moringa (*Moringa oleifera* Lam) leaf juice powder. *J Food Process Preserv*, 43(4): e13915, <https://doi.org/10.1111/jfpp.13915>.
- Luque, R., Clark, H. J. (2013). Valorisation of food residues: Waste to wealth using green chemical Technologies. *Sustain Chem Process*, 1, 10-12, <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-10>.
- Maa, Y. F., Costantino, H., Nguyen, P. A., ve Hsu, C. (1997). The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray dried protein particles. *Pharm Dev Technol*, 2: 213e223, <https://doi.org/10.3109/10837459709031441>.
- Machado, A. P. D., Rezende, C. A., Rodrigues, R. A., Barbero, G. F., Rosa, P. D. V. E., Martinez, J. (2018). Encapsulation of anthocyanin-rich extract from blackberry residues by spray-drying, freeze-drying and supercritical antisolvent. *Powder Technol*, 340: 553-562, [https://doi.org/10.1016/j.powtec.\(2018\).09.063](https://doi.org/10.1016/j.powtec.(2018).09.063).
- Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *J Food Compos Anal*, 20(2): 125-132, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.04.010>.
- Malamatari, M., Charisi, A., Malamataris, S., Kachrimanis, K., Nikolakakis, I. (2020). Spray drying for the preparation of nanoparticle-based drug formulations as dry powders for inhalation. *Processes*, 8(7), 788, <https://doi.org/10.3390/pr8070788>.
- Marques L. G., Freire, J. T. (2005). Analysis of freeze-drying of tropical fruits. *Drying Technol*, 23(9-11): 2169-2184, <https://doi.org/10.1080/07373930500212438>.
- Marques, G. R., Borges, S. V., Mendonça, K. S. D., Fernandes, R. V. B., Menezesab, E. G. T. (2014). Application of maltodextrin in green corn extract powder production. *Powder Technol*, 263: 89-95, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.05.001>.
- Menon, A., Stojceska, V., Tassou, S. A. (2020). A systematic review on the recent advances of the energy efficiency improvements in non-conventional food drying technologies. *Trends in Food Sci Tech*, 100: 67-76, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.014>.
- Miller, D. A., Gil, M. (2012). Spray-drying technology. In: *Formulating Poorly Water Soluble Drugs, AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*, Robert O. W., Alan B. W., Dave A. M. (ed.), Springer, New York, pp. 363-442.
- Mirabella N., Castellani V., Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *J Clean Prod*, 65: 28-41, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.10.051>.
- Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. *J Microbiol Methods*, 66(2): 183-19, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>.

- Moses, J. A., Norton, T., Alagusundaram, K., Tiwari, B. K. (2014). Novel drying techniques for the food industry. *Food Eng Rev*, 6(3): 43–55, DOI 10.1007/s12393-014-9078-7.
- Munekata, P. E. S., Franco, D., Trindade, M. A., Lorenzo, J. M. (2016). Characterization of phenolic composition in chestnut leaves and beer residue by LC-DAD-ESI-MS. *LWT - Food Sci Technol*, 68: 52-58, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.017>.
- Murador, D. C., Braga, A. R. C., Martins, P. L., Mercadante, A. Z., & de Rosso, V. V. (2019). Ionic liquid associated with ultrasonic-assisted extraction: A new approach to obtain carotenoids from orange peel. *Food research international*, 126: 108653, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108653>.
- Murali, S., Kar, A., Mohapatra, D., Kalia, P. (2014). Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. *Food Sci Technol Int*, 21(8); <https://doi.org/10.1177/1082013214557843>.
- Muzaffer, K., Kumar, P. (2015). Parameter optimization for spray drying of tamarind pulp using responsesurface methodology. *Powder Technol*, 279: 179-184, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.04.010>.
- Neacsua, I. M., Vaughana, N., Raikosa, V., Multaria, S., Duncanb, G. J., Duthiea, G. G., Russella, G. W. (2015). Phytochemical profile of commercially available food plant powders: their potential role in healthier food reformulations. *Food Chem*, 179: 159-169, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.128>.
- Nindo, C. I., Tang, J., (2007). Refractance Window dehydration technology: a novel contact drying method. *Dry Technol*, 25: 37–48, <https://doi.org/10.1080/07373930601152673>.
- Nireesha, G. R., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N. N. B. M., Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/freeze drying-an review. *Int J Novel Trends Pharm Sci*, 3(4): 87-98, <https://scienztech.org/ijntps/article/view/96>.
- Nuzzo, M., Millqvist-Fureby, A., Sloth, J., Bergenstahl, B. (2015). Surface composition and morphology of particles dried individually and by spray drying. *Dry Technol*, 33(6), 757-767.
- Oliveira, T. I. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Pereira, P. H. F., Moates, G. K., Wellner, N., Azeredo, H. M. C. (2016). Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chem*, 198: 113–118, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.080>.
- Oreopoulou, V., Tzia, C. (2007). Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants, Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry. *Science and Business Media*, (Oreopoulou, V. chief ed.), 209-232.
- Papoutsis, K., Golding, C. B., Vuong, Q., Pristijono, P., Stathopoulos, C. E., Scarlett, C. J., Bowyer, M. (2018). Encapsulation of Citrus By-Product Extracts by Spray-Drying and Freeze-Drying Using Combinations of Maltodextrin with Soybean Protein and ι -Carrageenan. *Foods*, 7(7): 115; <https://doi.org/10.3390/foods7070115>.
- Pereira, P. H. F., Oliveira, T. I. S., Rosa, M. F., Cavalcante, F. L., Moates, G. K., Wellner, N., Azeredo, H. M. C. (2016). Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *Int J Biol Macromol*, 88: 373–379, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.074>.
- Pereira, R. M., López, B. G. C., Diniz, S. N., Antunes, A. A., Garcia, D. M., Oliveira, C. R., & Marcucci, M. C. (2017). Quantification of flavonoids in Brazilian orange peels and industrial orange juice processing wastes. *Agricultural Sciences*, 8(07): 631, Doi: 10.4236/as.2017.87048.
- Phisut, N. (2012). Spray drying technique of fruit juice powder: Some factors influencing the properties of product. *Int Food Res J*, 19: 1297-1306.
- Pikal, M. J. (2002). Freeze drying. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker, New York (2002), pp. 1299-1326.
- Pisano, R., Barresi A. A., Fissore, D. 2011 Innovation in monitoring food freeze drying. *Dry Technol*, 29 (16): 1920-1931, <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.596299>.

- Prinn, K. B., Costantino, H. R., Tracy, M. (2002). Statistical Modeling of protein spray drying at the lab scale. *AAPS PharmSciTech*, 3: 32–39, <https://doi.org/10.1208/pt030104>.
- Putnik, P., Bursać Kovacević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes. *Molecules*, 22(5), <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>.
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *J Food Eng*, 49 (4): 311-319, [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00228-4).
- Ratti, C. (2013). Freeze drying for food powder production. Handbook of Food Powders Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, (Bhandari, B., chief ed.), Sawston, pp. 57-84.
- Rezende, Y. R. R. S., Nogueira, J. P., Narain, N. (2018). Microencapsulation of extracts of bioactive compounds obtained from acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp and residue by spray and freeze drying: Chemical, morphological and chemometric characterization. *Food Chem*, 254: 281-291, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.026>.
- Rocha, C. B. D., Noreña, C. P. Z. (2020). Microencapsulation and controlled release of bioactive compounds from grape pomace. *Dry Technol*, 1-15, DOI: 10.1080/07373937. (2020).1741004.
- Rodríguez, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends Food Sci Technol*, 17, 3-15, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.10.002>.
- Saikia, S., Mahnot, N. K., Mahanta, C. L. (2015). Optimisation of phenolic extraction from *Averrhoa carambola* pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chem*, 171: 144-152, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.064>.
- Salem, A., Fakhfakh, N., Jridi, M., Abdelhedi, O., Nasri, M., Debeaufort, F., Zouari, N. (2020). Microstructure and characteristic properties of dogfish skin gelatin gels prepared by freeze/spray-drying methods. *Int J Biol Macromol*, 162: 1-10, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.033>.
- Schössler, K., Jäger, H., Knorr, D. (2012). Novel contact ultrasound system for the accelerated freeze-drying of vegetables. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 16: 113-120, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.05.010>.
- Searles, J. A., Aravapalli, S., Hodge, C. (2017). Effects of chamber pressure and partial pressure of water vapor on secondary drying in lyophilization. *AAPS PharmSciTech*, 18(7): 2808-2813, <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0768-3>.
- Shishir, M. R. I., Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends Food Sci Technol*, 65: 49-67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>.
- Souza, A. S., Borges, S. V., Magalhães, N. F., Ricardo, H. V., Cereda, M. P., Daiuto, E. R. (2009). Influence of spray drying conditions on the physical properties of dried pulp tomato. *Food Sci Technol*, 29(2): 291-294, <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200008>.
- Sun, Q., Zhang, M., Mujumdar, A. S. (2019). Recent developments of artificial intelligence in drying of fresh food: A review. *Food Sci Nutr*, 59(14): 2258-2275, <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1446900>.
- Sun, X., Cameron, R. G., Bai, J. (2020). Effect of spray-drying temperature on physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of pectin/sodium alginate microencapsulated carvacrol. *Food Hydrocoll*, 100: 105420, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105420>.
- Telang, A. M., Thorat, B. N. (2010). Optimization of process parameters for spray drying of fermented soy milk. *Dry Technol*, 28 (12): 1445-1456, <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.482694>.

- Toledo, R., (2007). *Fundamentals of Food Process Engineering*, (Heldman, D. R. Chief ed.), 3rd ed. Aspen Publishers, Inc., Athens, GA, ISBN: 978-3-319-90097-1.
- Tontul, İ., Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends Food Sci Technol*, 63: 91-102, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>.
- Tsouko, E., Alexandri, M., Fernandes, K. V., Guimarães Freire, D. M., Mallouchos, A., Koutinas, A. A. (2019). Extraction of Phenolic Compounds from Palm Oil Processing Residues and Their Application as Antioxidants. *Food Technol Biotechnol*, 57(1): 29-38, <https://doi.org/10.17113/ftb.57.01.19.5784>.
- Venturi, F., Sanmartin, C., Taglieri, I., Nari, A., Andrich, G., Terzuoli, E., ... & Zinnai, A. (2017). Development of phenol-enriched olive oil with phenolic compounds extracted from wastewater produced by physical refining. *Nutrients*, 9(8): 916, <https://doi.org/10.3390/nu9080916>.
- Vidović, S. S., Vradić, J. Z., Vaštag, Z. G., Zeković, Z. P., Popović, L. M. (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technol*, 258: 209-215, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2014.03.038>.
- Voda, A., Homan, N., Witek, M., Duijster, A., Van Dalen, G., Van der Sman, R., et al. (2012). The impact of freeze-drying on microstructure and rehydration properties of carrot. *Food Res Int*, 49(2): 687-693, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.019>.
- Yan, J. K., Wu, L. X., Cai, W. D., Xiao, G. S., Duan, Y., & Zhang, H. (2019). Subcritical water extraction-based methods affect the physicochemical and functional properties of soluble dietary fibers from wheat bran. *Food chemistry*, 298, 124987, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124987>.
- Yerlikaya, S., Şen Arslan, H. (2019). Dondurularak ve püskürterek kurutulmuş süt tozlarının bazı mikrobiyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması. *Bitlis Eren Univ J Sci & Technol*, 8(2): 677 – 687, <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.511313>.
- Yılmaz F. M., Görgüç A., Gençdağ E. (2021). Recovery and Purification of Antioxidant Compounds from Plant Origin Agro-Industrial By-products. In: Ekiert H. M., Ramawat K. G., Arora J. (eds.) *Plant Antioxidants and Health*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-45299-5_24-2.
- Yu, Y., Lv, Y. (2019). Degradation kinetic of anthocyanins from rose (*Rosa rugosa*) as prepared by microencapsulation in freeze-drying and spray-drying. *International Int. J. Food Prop* 22(1): 2009 – 2021; <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1701011>.
- Zaky, A. A., Abd El-Aty, A. M., Ma, A., & Jia, Y. (2020). An overview on antioxidant peptides from rice bran proteins: extraction, identification, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-13, <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1842324>.
- Zhang, R., Zhou, L., Li, J., Oliveira, H., Yang, N., Jin, W., Zhu, Z., Li, S., He, J. (2020). Microencapsulation of anthocyanins extracted from grape skin by emulsification/internal gelation followed by spray/freezing-drying techniques: Characterization, stability and bioaccessibility. *LWT - Food Sci Tech*, 123: 109097, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109097>.
- Zhu, Z. J. He, J., Liu, G., Barba, F. J., Koubaa, M., Ding, L. et al. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innov Food Sci Emerg Tech*, 3: 1-9, DOI: 10.1016/j.ifset.2015.12.023.
- Ziaee, A., Albadarin, A. B., Padrela, L., Femmer, T., O'Reilly, E., Walker, G. (2019). Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. *Eur. J. Pharm. Sci*, 127: 300-318, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.02>.

KABAK VE KAYISI ÇEKİRDEĞİ YAĞLARININ YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONU, BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İlkin Yücel Şengün^{*1}, Ersin Yücel², Gülden Kılıç¹, Berna Öztürk¹

¹ Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir

² Eskişehir Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Eskişehir

Geliş / Received: 29.01.2021; Kabul / Accepted: 30.03.2021; Online baskı / Published online: 08.04.2021

Yücel Şengün, İ., Yücel, E., Kılıç, G., Öztürk, B. (2021). Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının yağ asidi kompozisyonu, biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi. GIDA (2021) 46(3) 608-620 doi: 10.15237/gida.GD21024

Yücel Şengün, İ., Yücel, E., Kılıç, G., Öztürk, B. (2021). Determination of fatty acid composition and bioactive properties of pumpkin seed and apricot kernel oils. GIDA (2021) 46(3) 608-620 doi: 10.15237/gida.GD21024

ÖZ

Bu çalışmada, Ankara’da yetiştirilen kabak çekirdeği ve Malatya’da yetiştirilen kayısı çekirdeğinden elde edilen sabit yağların yağ asidi kompozisyonları ve biyoaktif özellikleri incelenmiştir. Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının bileşiminde bulunan ana bileşenler linoleik ve oleik asit olarak tespit edilmiştir. Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 123.60 ve 86.75 mg GAE/100 g olarak belirlenmiştir. DPPH yöntemine göre kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının antioksidan aktivite değerleri sırasıyla %46.53 ve %39.61 iken ABTS yöntemine göre değerler %74.73 ve %49.05 olarak tespit edilmiştir. Kabak çekirdeği yağına karşı en hassas mikroorganizma *Escherichia coli* O157:H7 olarak tespit edilirken, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* ve *Salmonella* Typhimurium, kayısı çekirdeği yağlarına karşı en hassas mikroorganizmalar olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, sabit yağların gıda endüstrisinde doğal antioksidan ürünler olarak kullanılabilirliğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Cucurbita pepo* var. *styriaca*, *Prunus armeniaca* “Hacıhaliloğlu”, toplam fenolik madde, antioksidan, antimikrobiyel

DETERMINATION OF FATTY ACID COMPOSITION AND BIOACTIVE PROPERTIES OF PUMPKIN SEED AND APRICOT KERNEL OILS

ABSTRACT

In the study, fatty acid compositions and bioactive properties of fixed oils obtained from seeds of pumpkin grown in Ankara and kernels of apricot grown in Malatya were investigated. The main components in the composition of pumpkin seed and apricot kernel oils were identified as linoleic and oleic acids. The total phenolic contents of pumpkin seed and apricot kernel oils were determined as 123.60 and 86.75 mg GAE/100 g, respectively. According to DPPH method, the antioxidant activities of pumpkin seed and apricot kernel oils were determined as 46.53% and 39.61%, respectively, while the values were 74.73% and 49.05% according to ABTS method. The most sensitive microorganism against pumpkin seed oil was *Escherichia coli* O157:H7, while *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Salmonella* Typhimurium were determined as the most sensitive

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ ilkin.sengun@ege.edu.tr

☎ (+90) 232 311 3028

☎ (+90) 232 342 7592

İlkin Yücel Şengün; ORCID no: 0000-0001-6940-2129

Ersin Yücel; ORCID no: 0000-0001-8274-7578

Güliden Kılıç; ORCID no: 0000-0001-6125-6219

Berna Öztürk; ORCID no: 0000-0003-1104-1863

microorganisms to apricot kernel oil. The results showed that fixed oils could be used as natural antioxidant products in the food industry.

Keywords: *Cucurbita pepo* var. *styriaca*, *Prunus armeniaca* “Hacıhaliloğlu”, total phenolic content, antioxidant, antimicrobial

GİRİŞ

Günümüzde tüketicilerin sentetik ürünleri tüketmemeye yönelik eğilimleri artmakta ve bitkisel ürünlerin tüketimi gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Tajkarimi vd., 2010). Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, saponinler, flavonoidler, tiyosülfınatlar, glukozinolatlar ve organik asitler, bitkilerin antioksidan ve antimikrobiyel özelliklerine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır (Gyawali ve Ibrahim, 2014). Yağlı tohumların işlenmesiyle elde edilen sabit yağlar, insan beslenmesi için gerekli olduğu kadar sağlığımız açısından da büyük önem taşımaktadır (Karaca ve Aytaç, 2007). Yağlı tohumların antimikrobiyel aktivitesi, aktif bileşenlerin kimyasal yapılarına ve konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmektedir. Fenolik bileşiklerdeki hidroksil grupları bakterilerin hücre zarı ile etkileşime girerek hücrenin zar yapısını bozmakta ve hücrenin bileşenleri hücre dışına sızmaktadır (Xue vd., 2013). Ayrıca, sabit yağlarda bulunan oleik, linoleik ve palmitik asit gibi yağ asitlerinin antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir (Ababouch vd., 1994; Coşkun, 2006).

Cucurbita pepo L., 98 cins ve yaklaşık 965 türden oluşan Cucurbitaceae familyasına ait önemli bir tıbbi bitkidir (Morittu vd., 2019). Kabak çekirdeği protein, doymamış yağ asitleri, fitosteroller, E vitamini, Zn, K, Ca, Mg, Fe, Cu ve P gibi temel mineraller açısından oldukça zengindir (Badr vd., 2011; Gohari vd., 2011; Nourmohammadi vd., 2017). Kabak çekirdeği yağı insan sağlığı üzerinde antimikrobiyel, antioksidan, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antitümör, antikanser, antimutajenik, antihipertansif gibi etkilere sahiptir (Adnan vd., 2017; Dar vd., 2017; El-Sayed vd., 2017; Morittu vd., 2019). Çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu bildirilen kabak çekirdeği yağı kozmetik, ilaç ve gıda endüstrilerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Dar vd., 2017).

Rosaceae familyasına ait bir bitki olan *Prunus armeniaca* L., gıda endüstrisinde doğal antioksidan ajan olarak kullanılmaktadır (Gomaa, 2013; Zhou vd., 2016). Kayısı meyvesinin neoklorojenik ve klorojenik asit, proantosiyanidin dimer ve trimerler, kersetin ve kaempferol gibi aktif bileşenlere sahip olduğu bildirilmektedir (Sójka vd., 2015; Dulf vd., 2017). Ayrıca kayısı çekirdeği karbonhidrat, C ve K vitaminleri, niyasin, tiamin, mineraller, β -karoten, organik asitler, fenoller, flavonoidler, uçucu bileşikler, esterler, diyet proteininin yanı sıra önemli miktarda yağ ve lif içermektedir (Ali vd., 2011; Gomaa, 2013). Geleneksel tıpta kanama, hırıltı, astım, kısırlık ve göz iltihabı gibi çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır (Manzoor vd., 2012).

Literatürde farklı coğrafi bölgelerde yetişen kabak çekirdeği ve kayısı çekirdeği yağlarının özelliklerinin incelendiği çalışmalar bulunmaktadır (Amiran vd., 2015; Zhou vd., 2016; Dar vd., 2017; Ghaffar vd., 2018; Juhaimi vd., 2018). Bu çalışma kapsamında ise Ankara’da yetişen kabak çekirdeği ve Malatya’da yetişen kayısı çekirdeğinden elde edilen yağların yağ asidi kompozisyonu, toplam fenolik madde içeriği, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitki materyali

Kabak (*Cucurbita pepo* var. *styriaca*) çekirdeği Ankara/Polatlı’dan, kayısı (*Prunus armeniaca* “Hacıhaliloğlu”) örnekleri ise Malatya’dan toplanmıştır. Kabak ve kayısı çekirdekleri kabuklarından ve etlerinden ayrıldıktan sonra damıtılmış su ile yıkanmış ve oda sıcaklığında filtre kâğıdı üzerinde kurutulmuştur. Örnekler %10 nem oranında kurutulduktan sonra çekiçli değirmende öğütülmüş ve plastik kaplarda depolanmıştır.

Sabit yağ eldesi

Cucurbita pepo var. *styriaca* ve *Prunus armeniaca* “Hacıhaliloğlu” çekirdeği sabit yağları soğuk sıkım

yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Kıralan vd., 2014). Soğuk sıkım işlemi 35-40°C'ye ayarlı soğuk pres yağ çıkarma cihazı (Karaerler NF 500, Ankara, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yağ örnekleri 48 saat dinlendirildikten sonra süzölmüş ve deneylerde kullanılmak üzere koyu renkli cam şişelerde depolanmıştır. Örneklerden elde edilen yağ oranları *Cucurbita pepo* var. *styriaca* çekirdeği için %25, *Prunus armeniaca* "Hacıhaliloğlu" çekirdeği için ise %35 olarak belirlenmiştir.

Yağ asidi kompozisyonu

Kabak ve kayısı çekirdeği sabit yağlarının yağ asidi bileşenlerinin bağıl yüzdeleri, Anadolu Üniversitesi, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi'nde Agilent HP innowax kolon (60 m uzunluk x 0.25 mm iç çap; 0.25 µm film kalınlığı) ve Alev İyonlaşma Dedektörü ile donatılmış Agilent 7890B GC sistemi kullanılarak belirlenmiştir (USP, 1995). Örnekler 60°C'de 10 dakika bekletildikten sonra sıcaklık dakikada 4°C artırılıp 220°C'de 10 dakika tutulmuştur. Bu işlemi takiben örnekler, dakikada 1°C'lik artışla 240°C'de 20 dakika daha bekletilmiştir. Toplam analiz süresi 100 dakika olarak ayarlanmıştır. Hekzan ile seyreltilen 1 µL örnek (%10 h/h) sisteme 40:1 split oranı ile 250°C'de enjekte edilmiştir. Dedektör sıcaklığı 250°C'de tutulmuştur. Taşıyıcı gaz olarak helyum (0.7 mL/dakika) kullanılmıştır.

Örneklerin yağ asidi bileşenleri GC analizi ile aynı koşullar kullanılarak Agilent HP-Innowax kapiler kolonu ile donatılmış GC-MC Agilent 7890B GC 5977B Kütle Seçici Dedektör Sistemi ile tanımlanmıştır. GC-MS tespiti için 35-450 m/z kütle aralığında 70 eV elektron enerjisine sahip bir elektron iyonizasyon sistemi kullanılmıştır. İyon kaynağı sıcaklığı 230°C'dir. Ayrılan bileşenler, Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) tarafından tanımlanmıştır.

Toplam fenolik madde

Kabak ve kayısı çekirdeğinden elde edilen sabit yağların toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine göre tespit edilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). 2 g numune 1 mL hekzan içerisinde çözündürölmüş, ardından 1 mL metanol:saf su (60:40, h/h) çözeltisi ile

karıştırılmıştır. Karışım 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutulduktan sonra hekzan fazı 1 mL metanol:saf su (60:40, h/h) çözeltisi ile yeniden ekstrakte edilmiştir. Metanol ekstraktları toplam hacim 1 mL olacak şekilde saf su ile seyreltilmiştir.

6 mL ultra saf su ve 500 µL Folin-Ciocalteu çözeltisi karıştırılmış, ardından karışıma 100 µL metanol ekstraktı ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 8 dakika tutulmuştur. Daha sonra, karışıma 1.5 mL doymuş Na₂CO₃ (%20 w/v) çözeltisi ilave edilmiş ve 60 dakika bekletilmiştir. Örneğin absorbansı çift ışık yollu spektrofotometre (Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis) kullanılarak 765 nm dalga boyunda ölçölmüştür. Sonuçlar galik asit eşdeğeri (mg GAE/100 g) cinsinden ifade edilmiştir.

Antioksidan aktivite

DPPH yöntemi

Yağ örneklerinin DPPH radikal temizleme aktivitesi Naik vd. (2011) tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir. Yağ örneklerinin 1 mL seyreltilmiş metanol çözeltileri (100 µg/mL) 4 mL DPPH çözeltisi (0.1 mM) ile karıştırılmıştır. Karışım karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra absorbans spektrofotometre ile 515 nm dalga boyunda ölçölmüştür. Sonuçlar aşağıdaki Denklem 1 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$DPPH \text{ radikal temizleme aktivitesi (\%)} = \frac{Ak - A\ddot{o}}{Ak} \times 100 \quad (1)$$

Ak: kontrol absorbans değeri; Aö: örnek absorbans değeri

ABTS yöntemi

Sabit yağların antioksidan aktiviteleri ikinci bir yöntem olarak ABTS yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Re vd., 1999). Öncelikle, ABTS stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla 7 mM ABTS⁺ çözeltisi ve 2.45mM amonyum persülfat karıştırılmış ve 16 saat karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra ABTS⁺ çözeltisi etanol ile seyreltilerek 734 nm dalga boyunda 0.70 ± 0.02 absorbans değeri elde edilmiştir. 3 mL ABTS⁺ stok çözeltisi ile 0.3 mL yağ örneğinin etanol ekstraktı karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında 6 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Absorbans 734 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanılarak

ölçülmüştür. ABTS⁺ radikal temizleme aktivitesi Denklem 2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$ABTS \text{ radikal temizleme aktivitesi (\%)} = \frac{Ak - A\ddot{o}}{Ak} \times 100 \quad (2)$$

Ak: kontrol absorbens değeri; Aö: örnek absorbens değeri

Antimikrobiyel aktivite

Bakteri kültürleri

Bu çalışmada yedi farklı bakteri (*Bacillus subtilis* ATCC 6037, *Escherichia coli* ATCC 1103, *E. coli* O157:H7 ATCC 43895, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* 6538P ve *Salmonella Typhimurium* NRRLB 4420) sabit yağ örneklerinin antimikrobiyel aktivite değerlerinin belirlenmesi amacıyla test kültürü olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteri kültürleri Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mikrobiyolojisi Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Tryptic Soy Broth (TSB, pH 7.3±0.2, Oxoid) stok kültürlerin aktivasyonu amacıyla kullanılmış ve kültürler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bakteri kültürlerinin yoğunluğu 0.5 McFarland (DEN-1 McFarland Densitometer, Grant-bio) değeri olacak şekilde ayarlanmıştır.

Disk difüzyon yöntemi

Yağ örneklerinin antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Deng vd., 2014). Öncelikle kültürler Mueller Hinton Agar (MHA, Oxoid, pH 7.3 ± 0.2) besiyerine yayma plak yöntemine göre ekilmiş, kültürün besiyeri tarafından absorbe edilmesinin ardından besiyeri üzerine, 20 µL sabit yağ emdirilmiş (40 mg/mL) 6 mm çaplı kağıt diskler belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. Ekim yapılan petripler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda inhibisyon zonlarının çapları cetvel kullanılarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak ampisilin (AMP, 10 µg/disk, Oxoid) ve gentamisin (GEN, 10 µg/disk, Oxoid) diskleri ve negatif kontrol olarak ise steril su emdirilmiş diskler kullanılmıştır.

Sıvı dilüsyon yöntemi

Yağ örneklerinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) sıvı dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Deng vd., 2014).

Örneklerin MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu "U" tipi steril mikroyuvalar kullanılmıştır. %5 dimetil sülfoksit (DMSO, Merck) içerisinde çözündürülmüş örnekler son konsantrasyon 0.2-100 µg/mL aralığında olacak şekilde kuyucuklara aktarılmış, ardından üzerine 100 µL test kültürü ilave edilmiştir. Hazırlanan pleytler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 µL %0.5'lik 2,3,5 trifenil tetrazolyum klorit (TTC, Merck) ilave edilmiş ve pleytler 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda yağ örneklerinin MİK değerleri kuyucuklarda oluşan renk değişimlerine göre değerlendirilmiştir. Minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerinin belirlenmesi amacıyla gelişme olan her bir kuyucuktan MHA besiyerine ekim yapılmış ve petripler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Tomas-Menor vd., 2013).

İstatistiksel değerlendirme

Denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, SPSS 20 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklar Bağımsız Örneklem T testleri ile $P < 0.05$ önem seviyesinde belirlenmiştir (SPSS, 2011).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Örneklerin yağ asidi kompozisyonu

Çalışmada, kabak çekirdeği yağının toplam yağ asidi kompozisyonunun %97.8'ini temsil eden 4 yağ asidi tanımlanırken, kayısı çekirdeği yağının yağ asidi kompozisyonunun %99'unu temsil eden 5 yağ asidi tespit edilmiştir (Çizelge 1). Kabak çekirdeği yağının ana yağ asidi bileşenleri linoleik (%41.1) ve oleik asit (%38.6) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, kayısı çekirdeği yağında ağırlıklı olarak bulunan yağ asidi bileşenlerinin oleik (%63.5) ve linoleik asit (%28.1) olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan önceki çalışmalarda; İran, Tunus, Çin, Türkiye, Pakistan ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yetişen kabak bitkisinin çekirdeğinden elde edilen sabit yağlarda bulunan yağ asitlerinin temel bileşenlerinin bu çalışmadaki bulgulara benzer şekilde linoleik (%39.84, %50.88, %44.51-47.67, %37.62-49.25, %43.65,

%35.38-%64.05), oleik (%38.42, %25.82, %37.35-37.54, %31.65-43.43, %19.95, %18.42-%46.09), palmitik (%10.68, %14.83, %11.53-12.48, %9.98-12.41, %14.94, %6.71-%12.64) ve stearik asit (%8.67, %6.68, %3.08-5.09, %6.20-7.28, %6.47, %3.35-%7.65) olduğu tespit edilmiştir (Gohari vd., 2011; Bardaa vd., 2016; Li vd., 2016; Türkmen vd., 2017; Ghaffar vd., 2018; Meru vd., 2018). Benalia vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, Cezayir'de yetişen kabak bitkisinin

çekirdeğinden elde edilen sabit yağda bulunan ana bileşenlerin sırasıyla linoleik (%42.10-48.50), oleik (%18.40-39.60), palmitik (%13.91-20.00) ve araşidik asit (%0.65-1.50) olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma kapsamında incelenen kabak çekirdeği yağının yağ asidi temel bileşenleri açısından önceki çalışmalara benzerlik gösterdiği, baskın yağ asitlerinin linoleik ve oleik asit olduğu, ancak literatürden farklı olarak bu çalışmada incelenen örneğin palmitik asit içermediği tespit edilmiştir.

Çizelge 1. Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının yağ asidi kompozisyonu
Table 1. Fatty acid composition of pumpkin seed and apricot kernel oils

Yağ asidi kompozisyonu <i>Fatty acid composition</i>	Bağıl yüzde (%) <i>Relative content (%)</i>	
	Kabak çekirdeği <i>Pumpkin seed</i>	Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>
Palmitik asit (C16:0) <i>Palmitic acid (C16:0)</i>	11.2	5.2
Palmitoleik asit (C16:1); ω-9 <i>Palmitoleic acid (C16:1); ω-9</i>	-	1.1
Stearik asit (C18:0) <i>Stearic acid (C18:0)</i>	6.9	-
Oleik asit (C18:1); ω-9 <i>Oleic acid (C18:1); ω-9</i>	38.6	63.5
Elaidik asit (C18:1); ω-9 <i>Elaidic acid (C18:1); ω-9</i>	-	1.1
Linoleik asit (C18:2); ω-6 <i>Linoleic acid (C18:2); ω-6</i>	41.1	28.1
Toplam yağ asidi <i>Total fatty acid</i>	97.8	99.0

Yapılan önceki çalışmalarda Himaçal Pradeş/Hindistan, Pakistan, Çin, Uttrakhand/Hindistan ve Türkiye'de yetişen kayısı bitkisinin çekirdeğinden elde edilen sabit yağlarda bulunan ana bileşenlerin oleik (%62.07-70.60, %62.34-80.97, %70.29-71.25, %71.00, %65.98-71.86), linoleik (%20.50-27.76, %13.13-30.33, %22.31-23.00, %20.15, %20.18-22.74) ve palmitik asit (%5.00-7.79, %3.35-5.93, %4.57-4.87, %4.20, %5.87-6.78) olduğu tespit edilmiştir (Gupta vd., 2012; Manzoor vd., 2012; Zhou vd., 2016; Yadav vd., 2018; Juhaimi vd., 2018). Yapılan diğer bir çalışmada, İran'da yetişen kayısı bitkisinin çekirdeğinden elde edilen heksan

ekstraktlarında ağırlıklı olarak linoleik (%51.60) ve palmitik asit (%23.00) bulunduğu tespit edilmiştir (Amiran vd., 2015). Önceki çalışma sonuçları ile kıyaslandığında, bu çalışmada incelenen kayısı çekirdeği yağının linoleik, oleik ve palmitik asit miktarlarının literatürle uyum içerisinde olduğu, özellikle linoleik asit miktarının, literatürde yer alan birçok örneğe kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, sabit yağların yağ asidi bileşenlerinin bitkilerin çeşidi, işleme ve saklama koşulları ve yetiştiği coğrafi bölgeye bağlı olarak değişim gösterebileceğini ortaya koymuştur.

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı

Fenolik bileşikler, radikal temizleyici, metal kelatör, indirgen ajan, hidrojen verici ve tekli oksijen yakalayıcı olmaları sebebiyle önemli maddelerdir. Fenolik bileşiklerin sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı, son yıllarda gıda ve ilaç sanayinde fenolik bileşikler yönünden zengin tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımı artış göstermiştir (Proestos vd., 2006). Bu nedenle, bu çalışmada fenolik maddelerce zengin birer kaynak olduğu düşünülen kabak çekirdeği ve kayısı çekirdeği yağlarının toplam fenolik madde miktarları belirlenmiştir (Çizelge 2). Kabak çekirdeği yağında toplam fenolik madde miktarı 123.60 mg GAE/100 g olarak belirlenmiş, kayısı çekirdeği yağında ise bu değer daha düşük (86.75 mg GAE/100 g) olarak tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Yapılan bir çalışmada İran'da yetişen kabak bitkisinin çekirdeğinden elde edilen sabit yağın toplam fenolik madde miktarı 6.62 mg GAE/100 g olarak tespit edilmiştir (Gohari vd., 2011). Li vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Çin'de yetişen kabak çekirdeğinin sulu enzimatik ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 11.77 mg GAE/100 g olarak tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, kabak (İtalya'da yetişen) çekirdeği etanol ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 98.63 mg GAE/100 g olarak belirlenmiş ve epikateşin, syringic asit, rutin, hesperidin, kuersetin-3-O-glikozit, kafeik asit gibi fenolik bileşenlerce zengin kaynaklar olduğu bildirilmiştir (Morittu vd., 2019). Tüm bu verilerle kıyaslandığında, tarafımızca yürütülen çalışma kapsamında incelenen kabak çekirdeği yağının toplam fenolik madde miktarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, Pakistan ve Mısır'da yetişen kabak bitkisi çekirdeğinin toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 4590-7310 mg GAE/100 g ve 5641 mg GAE/100 g olarak belirlenmiştir (Ali vd., 2011; Hashash vd., 2017).

Yapılan çalışmalarda, kayısı çekirdeğinin gallik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit, syringic asit, kuersetin, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, 3,4-dihidroksi benzoik asit, β -karoten ve γ -karoten gibi fenolik bileşenlerce zengin olduğu bildirilmiştir (Dragovic-Uzelac vd., 2007; Korekar

vd., 2011; Juhaimi vd., 2018). Kayısı çekirdeği toplam fenolik madde içeriğinin belirlendiği bir çalışmada, Afganistan'da yetişen kayısı çekirdeği metanol, aseton ve metanol-aseton karışımı ile ekstrakte edilmiş ve ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının sırasıyla 32.90-65.50 mg GAE/100 g, 59.30-96.60 mg GAE/100 g ve 92.20-162.10 mg GAE/100 g arasında değişim gösterdiği bildirilmiştir (Korekar vd., 2011). Yapılan diğer çalışmalarda, Pakistan ve Hindistan'da yetişen kayısı çekirdeği yağlarında toplam fenolik madde miktarlarının 4590-7310 mg GAE/100 g ve 1400 mg GAE/100 g olduğu belirlenmiştir (Ali vd., 2011; Sharma vd., 2014). Türkiye'de (Malatya) yetişen dört farklı kayısı bitkisinden elde edilen sabit yağların incelendiği bir çalışmada ise örneklerin toplam fenolik madde miktarlarının 27.18-38.51 mg GAE/100 g olduğu tespit edilmiştir (Juhaimi vd., 2018). Bu çalışmada incelenen kayısı çekirdeği yağlarının Türkiye'de yetişen diğer kayısı çekirdeği yağlarına kıyasla daha yüksek miktarda toplam fenolik madde içerdiği, bununla birlikte bu miktarın, literatürde yer alan bazı verilere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar, bitkilerin toplam fenolik madde miktarlarının bitki çeşidi ve bitkinin yetiştiği coğrafi bölge gibi faktörlere bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir.

Örneklerin antioksidan aktivite değerleri

DPPH ve ABTS yöntemi, bitki özütleri veya bileşiklerinin serbest radikal temizleyicileri veya hidrojen vericileri olarak işlev görme potansiyelini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, kabak ve kayısı çekirdeğinden elde edilen yağların antioksidan aktiviteleri bu iki yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Kabak çekirdeği yağı DPPH ve ABTS radikallerini sırasıyla %46.53 ve %74.73 oranında inhibe etmiştir (Çizelge 2). Kayısı çekirdeği yağının antioksidan aktivitesi değerleri ise %39.61 (DPPH) ve %49.05 (ABTS) olarak tespit edilmiştir.

Morittu vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, İtalya'da yetişen kabak bitkisi çekirdeğinden elde edilen sabit yağın DPPH ve ABTS serbest radikallerinin %50'sini temizlemek için gerekli konsantrasyon (IC50) sırasıyla 55.18

ve 3.62 µg/mL olarak belirlenmiştir. Yapılan diğer çalışmada, Mısır'da yetişen kabak meyvesi ve çekirdeğinin metanol ekstraktının IC50 değerleri sırasıyla 643.09 ve 576.19 µg/mL olarak tespit edilmiştir (Hashash vd., 2017). Mısır'da yetişen kabak bitkisinin çiçek, kök ve yapraklarından elde edilen metanol ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin belirlendiği bir çalışmada, örneklerin DPPH radikalini temizleme aktiviteleri 584.81-667.46 µg/mL (IC50 değeri) arasında değişim göstermiştir. Bununla birlikte, ABTS yöntemine göre örneklerin antioksidan aktivitelerinin 18.10-35.03 mmol Trolox/100 mL ekstrakt aralığında değişim gösterdiği tespit edilmiştir (El-Sayed vd., 2017). Dar vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, Pakistan'da

yetişen kabak çekirdeğinin 100 µg/mL konsantrasyonundaki çeşitli ekstraktlarının (su, etil asetat, *n*-bütanol ve etanol) antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve ekstraktların DPPH radikalini sırasıyla %22.84, %27.1, %11.45 ve %14.62 oranında inhibe ettiği, etil asetat ve su ekstraktının diğer ekstraktlara nazaran daha yüksek antioksidan aktivite değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçları, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre oldukça düşük bulunmuştur (Çizelge 2). Literatürde yer alan tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, kullanılan ekstraksiyon yöntemi, çözücü çeşidi ve analiz yönteminin bitkilerin antioksidan aktivite değerlerini etkilediğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 2. Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite değerleri

Table 2. Total phenolic content and antioxidant activity of pumpkin seed and apricot kernel oils

Biyoaktif özellikler <i>Bioactive properties</i>	Kabak çekirdeği <i>Pumpkin seed</i>	Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>
Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/100 g) Total phenolic content (mg GAE/100 g)	123.60±0.57 ^a	86.75±2.62 ^b
DPPH (%)	46.53±1.77 ^a	39.61±2.77 ^a
ABTS (%)	74.73±0.68 ^a	49.05±2.74 ^b

* Aynı satırda yer alan farklı harflere (a, b) sahip değerler $P < 0.05$ 'te önemli ölçüde farklıdır.

* *Values in the same row with different letters (a, b) are significantly different at $P < 0.05$.*

Bitkilerin antioksidan aktivitesi bitkinin türü, bileşimi ve konsantrasyonu gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak da değişim gösterebilmektedir. Kayısı çekirdeği yağının antioksidan aktivitesinin DPPH yöntemi kullanılarak belirlendiği bir çalışmada, Türkiye'de yetişen dört farklı kayısı türünden (Çataloğlu, Hasanbey, Kabaş ve Soğancıoğlu) elde edilen sabit yağın antioksidan aktivitesi sırasıyla %53.98, %59.61, %55.74 ve %54.41 olarak tespit edilmiştir (Juhaimi vd., 2018). Yapılan diğer bir çalışmada, Mısır'da yetişen tatlı kayısı çekirdeğinin su, metanol ve etanol ekstraktlarının DPPH radikalini sırasıyla %45.68, %65.45 ve %51.39 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir (Gomaa, 2013). Ali vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise, Pakistan'da yetişen kayısı bitkisinin antioksidan aktivitesinin %56.84-%82.33 aralığında değişim gösterdiği rapor edilmiştir. Tarafımızca yürütülen bu

çalışmadan elde edilen sonuçlar ise literatür verileri ile paralellik göstermektedir (Çizelge 2).

Serbest radikaller, hücre yapısındaki protein, nükleik asit, lipit ve DNA'ya zarar vermekte ve dolayısıyla gastrointestinal hastalıklar, karaciğer tahribatı, diyabet, kanser, katarakt gibi çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Doğal besin kaynaklarında bulunan antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri temizleme ve stabilize etme yeteneğine sahip olan moleküllerdir (Kasnak ve Palamutoğlu, 2015). Bu çalışmanın sonuçları, kabak ve kayısı çekirdeği yağının sentetik antioksidanlara karşı alternatif olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Örneklerin antimikrobiyel aktivite değerleri

Kabak ve kayısı çekirdeğinden elde edilen sabit yağların antimikrobiyel aktivitesi yedi farklı

mikroorganizmaya karşı iki farklı yöntem kullanılarak (disk difüzyon ve sıvı dilüsyon yöntemi) incelenmiştir. Disk difüzyon yöntemi sonuçlarına göre kabak ve kayısı çekirdeği yağlarına karşı en hassas mikroorganizmalar sırasıyla *E. coli* O157:H7 (7.0 mm) ve *S.*

Typhimurium (9.5 mm) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Bununla birlikte kabak çekirdeği yağının incelenen test kültürlerinden sadece biri üzerine inhibitif etki gösterdiği, kayısı çekirdeği yağının ise üç kültür üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının inhibisyon zon çapları
Table 3. Diameter of inhibition zones of pumpkin seed and apricot kernel oils

Test mikroorganizmalar <i>Test microorganisms</i>	İnhibisyon zon çapı <i>Diameter of inhibition zone</i>		PC		NC
	Kabak çekirdeği <i>Pumpkin seed</i>	Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>	AMP	GEN	SS <i>SW</i>
<i>L. monocytogenes</i>	6.0±0.0	7.5±0.5	28.0±2.0	28.5±1.5	6.0±0.0
<i>E. faecalis</i>	6.0±0.0	7.0±0.0	21.0±1.0	14.5±0.5	6.0±0.0
<i>B. subtilis</i>	6.0±0.0	6.0±0.0	29.0±1.0	29.5±0.5	6.0±0.0
<i>S. aureus</i>	6.0±0.0	6.0±0.0	35.5±0.5	22.5±0.5	6.0±0.0
<i>E. coli</i> O157:H7	7.0±0.0	6.0±0.0	11.5±0.5	18±0.0	6.0±0.0
<i>S. Typhimurium</i>	6.0±0.0	9.5±2.1	18.0±2.0	20±0.0	6.0±0.0
<i>E. coli</i>	6.0±0.0	6.0±0.0	20.5±0.5	21.5±1.5	6.0±0.0

PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol, AMP: Ampisilin; GEN: Gentamisin; SS: steril su
İnhibisyon zon çapı (mm), steril diskin çapı 6 mm dahildir.

PC: Positive control, NC: Negative control, AMP: Ampicillin; GEN: Gentamycin; SW: sterile water
Inhibition zone diameter (mm), including diameter of sterile disk 6 mm

Yapılan bir çalışmada, Pakistan'da yetişen kabak çekirdeğinden elde edilen etil asetat, *n*-hekzan, etanol, su ve *n*-bütanol ekstraktlarının *B. subtilis*, *S. aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine antimikrobiyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiş ve kabak çekirdeğinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyel aktivitesi kullanılan ekstraksiyon yöntemi ve test mikroorganizmasına bağlı olarak 8.25-15.5 mm arasında değişim göstermiştir. Bununla birlikte *n*-hekzan ve etanol ekstraktlarının test mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyel aktivitesi tespit edilememiştir (Dar vd., 2017). Badr vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, Mısır'da yetişen kabak çekirdeği sabit yağının *Saccharomyces cerevesia* üzerine yüksek antimikrobiyel aktivite gösterirken *B. subtilis* ve *B. cereus* üzerine antimikrobiyel aktivite göstermediği belirlenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, bizim

yürütmüş olduğumuz çalışmanın sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Yürütülen çalışma kapsamında, kayısı çekirdeği yağının incelenen test kültürlerinden sadece *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* ve *E. faecalis* üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Sharma vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, Hindistan'da yetiştirilen kayısı bitkisinin metanol ekstraktının *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* ve *Proteus mirabilis* üzerine antimikrobiyel aktivitesi agar difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiş ve ekstraktın *S. aureus* ve *B. subtilis* üzerine antimikrobiyel aktivitesi sırasıyla 22 ve 19 mm olarak tespit edilmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada, Güney Kore'de yetişen kayısı çekirdeği esansiyel yağının *B. cereus*, *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Serratia marcescens* üzerine antimikrobiyel aktivitesi 8.8-15.8 mm aralığında

belirlenmiştir (Lee vd., 2014). İran'da yetişen kayısı çekirdeğinden elde edilen hekzan ekstraktının antimikrobiyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak incelenmiş ve yedi farklı mikroorganizmaya karşı 7.9-16.3 mm aralığında inhibisyon zonu oluşturduğu ancak *S. aureus* üzerine inhibitif etki göstermediği tespit edilmiştir (Amiran vd., 2015).

Sıvı dilüsyon yönteminde de disk difüzyon yöntemine paralel şekilde, kabak çekirdeği sabit yağı *E. coli* O157:H7, kayısı çekirdeği sabit yağı ise *L. monocytogenes*, *E. faecalis* ve *S. Typhimurium* üzerine 100 µg/mL konsantrasyonda inhibitif etki göstermiştir (Çizelge 4). Ayrıca, çalışmada kullanılan sabit yağların 100 µg/mL konsantrasyonda test edilen tüm mikroorganizmalara karşı bakterisidal etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4. Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK)

Table 4. Minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of pumpkin seed and apricot kernel oils

Test mikroorganizmalar <i>Test microorganisms</i>	MİK değeri (µg/mL) <i>MIC value (µg/mL)</i>		MBK değeri (µg/mL) <i>MBC value (µg/mL)</i>	
	Kabak çekirdeği <i>Pumpkin seed</i>	Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>	Kabak çekirdeği <i>Pumpkin seed</i>	Kayısı çekirdeği <i>Apricot kernel</i>
<i>L. monocytogenes</i>	>100	100	>100	>100
<i>E. faecalis</i>	>100	100	>100	>100
<i>B. subtilis</i>	>100	>100	>100	>100
<i>S. aureus</i>	>100	>100	>100	>100
<i>E. coli</i> O157:H7	100	>100	>100	>100
<i>S. Typhimurium</i>	>100	100	>100	>100
<i>E. coli</i>	>100	>100	>100	>100

Literatürde kabak çekirdeği bitkisinden elde edilen sabit yağların antimikrobiyel aktivitesinin sıvı dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Türkiye'de (Kırşehir) yetiştirilen kabak çekirdeğinden elde edilen sabit yağın *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus* ve *B. subtilis* üzerine MİK değerleri 8-128 µg/mL aralığında bulunmuştur (Sener vd., 2006). Yapılan diğer bir çalışmada, Amerika'da satışa sunulan kabak çekirdeği esansiyel yağının *B. anthracis*, *E. coli* ve *Helicobacter pylori* üzerine MİK değeri >8 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Preuss vd., 2005). Güney Kore'de yetiştirilen kayısı bitkisinin tohumundan elde edilen esansiyel yağın *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. marcescens* ve

Shigella sonnei üzerine MİK ve MBK değerlerinin sırasıyla 500-4000 µg/mL ve 250-8000 µg/mL aralığında değişim gösterdiği belirlenmiştir (Lee vd., 2014). Nafis vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ise, Fas'da yetişen kayısı çekirdeğine ait esansiyel yağın *Micrococcus luteus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* üzerine antimikrobiyel aktivitesi incelenmiştir. Kayısı çekirdeği esansiyel yağının MİK değerinin test kültürüne bağlı olarak 11.7-23.4 mg/mL aralığında olduğu tespit edilmiştir. Tarafımızca yürütülen çalışma kapsamında incelenen kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının antimikrobiyel aktivitesinin bu çalışmalara kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan tüm bu çalışmalar, kabak ve kayısı çekirdeği bitkilerinin antimikrobiyel aktivitesinin bitki türü, bitkinin yetiştiği coğrafi konum, ekstraksiyon yöntemi, kullanılan test kültürü ve analiz metoduna bağlı

olarak değişebileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, bitkilerin farklı bölgelerinden elde edilen esansiyel veya sabit yağlarının antimikrobiyel aktivitesinin, yağ içeriğinde bulunan yağ asitleri gibi maddelerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Bununla birlikte, bitkilerde bulunan yağ asitlerinin farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktiviteleri birçok çalışma ile incelenmiş, ancak etki mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılammıştır. Ancak son araştırmalar başta linoleik asit olmak üzere oleik, linolenik ve araşidonik asit gibi yağ asitlerinin, bakteriyel yağ asidi sentezinin temel bir bileşeni olan enoil-açıl taşıyıcı protein redüktazı (Fab I), seçici olarak inhibe ettiğini göstermekte ve bu şekilde mikroorganizmaların gelişimini engellediği bildirilmektedir (Sun vd., 2003; Seidel ve Taylor 2004; Zheng vd., 2005; Kaithwas vd., 2011). Ek olarak, yağ asitlerinin Gram pozitif ve mayalara karşı daha yüksek antimikrobiyel aktivite gösterdiği ve farklı bitkilerde bulunan linoleik, oleik ve palmitik asit gibi yağ asitlerinin *B. cereus* ve *Clostridium botulinum* gibi mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel aktivite gösterdiği belirtilmektedir (Ababouch vd., 1992; 1994; Coskun, 2006). Dolayısıyla, kabak ve kayısı çekirdeği yağının antimikrobiyel aktivitesinin linoleik ve oleik asit gibi yağ asitlerini yüksek oranda içermesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, kabak ve kayısı çekirdeği sabit yağlarının serum kolesterolü ve kan basıncını düşürücü etkileri olan linoleik ve oleik asit gibi esansiyel yağ asitlerini yüksek oranda içerdiğini ortaya koymuştur. Çalışmada incelenen yağ örneklerinin yüksek miktarda fenolik madde içerdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte örneklerin antioksidan aktivite değerlerinin literatür ile karşılaştırıldığında önemli seviyede yüksek olduğu, örnekler arasındaki farklılığın ise sadece ABTS yöntemine göre anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Kabak çekirdeği yağının çalışma kapsamında incelenen test kültürlerinden sadece *E. coli* O157:H7 üzerine inhibitif etki gösterdiği, kayısı çekirdeği yağının ise *L. monocytogenes*, *E. faecalis* ve *S. Typhimurium* üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar, kabak ve kayısı çekirdeği yağının gıda ve ilaç

endüstrisi için antimikrobiyel ve antioksidan ajan olarak önemli bir potansiyel sunduğunu göstermiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makale ile ilgili olarak başka kişiler ve/veya kurumlar arasında bir çıkar çatışması yoktur.

YAZAR KATKILARI

İYŞ ve EY fikir/kavram, tasarım, denetleme/danışmanlık, yöntem, analiz ve yorum ile makalenin genel düzeni aşamasına katkı sağlamıştır. GK ve BÖ laboratuvar analizlerini gerçekleştirmiştir. Tüm yazarlar makalenin yazımına katkıda bulunmuş, son halini okumuş ve onaylamışlardır. Makalenin hazırlanmasında başka kişi ve/veya kurumların katkısı yoktur.

KAYNAKLAR

- Ababouch, L., Chaibi, A., Busta, F.F. (1992). Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. *J. Food Prot.* 55: 980-984, doi:10.4315/0362-028X-55.12.980.
- Ababouch, L., Bouqartacha, F., Busta, F.F. (1994). Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Microbiol.* 55: 327-336, doi: 10.1006/fmic.1994.1037.
- Adnan, M., Gul, S., Batool, S., Fatima, B., Rehman, A., Yaqoob, S., Shabir, H., Yousaf, T., Mussarat, S., Ali, N., Khan, S.N., Rahman, H., Aziz, M.A. (2017). A review on the ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and nutritional composition of *Cucurbita pepo* L. *J of Phytopharmacology*, 6(2): 133-139.
- Ali, S., Masud, T., Abbasi, K.S. (2011). Physico-chemical characteristics of apricot (*Prunus armeniaca* L.) grown in Northern Areas of Pakistan. *Sci Horti.* 130(2): 386-392, doi: 10.1016/j.scienta.2011.05.040.
- Amiran, F., Shafaghat, A., Shafaghatlonbar, M. (2015). Omega-6 content, antioxidant and antimicrobial activities of hexanic extract from *Prunus armeniaca* L. kernel from North-West Iran. *National Academy Science Letters*, 38(2): 107-111, doi: 10.1007/s40009-014-0284-x.

- Badr, S.E., Shaaban, M., Elkholy, Y.M., Helal, M.H., Hamza, A.S., Masoud, M.S., El Safty, M.M. (2011). Chemical composition and biological activity of ripe pumpkin fruits (*Cucurbita pepo* L.) cultivated in Egyptian habitats. *Nat Prod Res*, 25(16): 1524-1539, doi: 10.1080/14786410903312991.
- Bardaa, S., Halima, N.B., Aloui, F., Mansour, R.B., Jabeur, H., Bouaziz, M., Sahnoun, Z. (2016). Oil from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: evaluation of its functional properties on wound healing in rats. *Lipids in Health and Disease*, 15(1): 1-12, doi: 10.1186/s12944-016-0237-0.
- Benalia, M., Djeridane, A., Gourine, N., Nia, S., Ajandouz, E., Yousfi, M. (2015). Fatty acid profile, tocopherols content and antioxidant activity of algerian pumpkin seeds oil (*Cucurbita pepo* L.). *Med J Nutrition Metab*, 8(1): 9-25, doi: 10.3233/mnm-140023.
- Coşkun, F. (2006). Gıdalarda bulunan doğal koruyucular. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2: 27-33.
- Dar, P., Farman, M., Dar, A., Khan, Z., Munir, R., Rasheed, A., Waqas, U. (2017). Evaluation of antioxidant potential and comparative analysis of antimicrobial activity of various extracts of *Cucurbita pepo* L. leaves. *J Agric Sci Food Technol*, 3: 103-109.
- Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., Zhao, Y. (2014). Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blueberry leaf extracts. *Food Control*, 38: 184-191 doi: 10.1016/j.foodcont.2013.10.023.
- Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., Boras, M. (2007). The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chem*, 102: 966-975, doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.001.
- Dulf, F.V., Vodnar, D.C., Dulf, E.H., Pintea, A. (2017). Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. *Chem Cent J*, 11(1): 1-10, doi: 10.1186/s13065-017-0323-z.
- El-Sayed, M.M., Hashash, M.M., Abdel-Hady, A.A., Abdel-Hady, H., Abdel-Lateef, E.E., Morsi, E.A. (2017). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of *Lantana camara* and *Cucurbita pepo* (Squash) extracts as well as GC-MS analysis of *Lantana camara* essential oils. *World J Pharm Res*, 6(1): 137-153.
- Ghaffar, F., Kainat, B., Shah, H., Akram, M. (2018). Nutritional, physico-chemical, antimicrobial and antioxidant screening of seed and seed oil of *Cucurbita pepo* grown in Kpk, Pakistan. *FUUAST Journal of Biology*, 8(1): 41-48.
- Gohari, A.A., Farhoosh, R., Haddad, K.M. (2011). Chemical composition and physicochemical properties of pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *Styriaca*) grown in Iran. *J Agric Sci Technol*, 13: 1053-1063.
- Gomaa, E.Z. (2013). In vitro antioxidant, antimicrobial, and antitumor activities of bitter almond and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Food Sci Biotechnol*, 22(2): 455-463, doi: 10.1007/s10068-013-0101-1.
- Gupta, A., Sharma, P.C., Tilakratne, B.M.K.S., Verma, A.K. (2012). Studies on physico-chemical characteristics and fatty acid composition of wild apricot (*Prunus armeniaca* Linn.) kernel oil. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(3): 366-370.
- Gyawali, R., Ibrahim, S.A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46: 412-429, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.
- Hashash, M.M., El-Sayed, M.M., Abdel-Hady, A.A., Hady, H.A., Morsi, E.A. (2017). Nutritional potential, mineral composition, and antioxidant activity Squash (*Cucurbita pepo* L.) fruits grown in Egypt. *Inflammation*, 9(10): 11-12.
- Juhaimi, F.A., Özcan, M.M., Ghafoor, K., Babiker, E.E. (2018). The effect of microwave roasting on bioactive compounds, antioxidant activity and fatty acid composition of apricot kernel and oils. *Food Chem*, 243: 414-419, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.09.100.

- Kaithwas, G., Mukerjee, A., Kumar, P., Majumdar, D.K. (2011). *Linum usitatissimum* (linseed/flaxseed) fixed oil: antimicrobial activity and efficacy in bovine mastitis. *Inflammopharmacology*, 19(1): 45-52, doi: 10.1007/s10787-010-0047-3.
- Karaca, E., Aytaç, S. (2007). Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 22(1): 123-131.
- Kasnak, C., Palamutoğlu, R. (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Turkish J. Agri-Food Sci Techn* 3(5): 226-234, doi: 10.24925/turjaf.v3i5.226-234.171.
- Kıralan, M., Özkan, G., Bayrak, A., Ramadan, M.F. (2014). Physicochemical properties and stability of black cumin (*Nigella sativa*) seed oil as affected by different extraction methods. *Ind Crop Prod*, 57: 52-58, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.03.026.
- Korekar, G., Stobdan, T., Arora, R., Yadav, A., Singh, S.B. (2011). Antioxidant capacity and phenolics content of apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel as a function of genotype. *Plant Foods Hum Nutr*, 66(4): 376-383, doi: 10.1007/s11130-011-0246-0.
- Lee, H.H., Ahn, J.H., Kwon, A.R., Lee, E.S., Kwak, J.H., Min, Y.H. (2014). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of apricot seed. *Phytotherapy Res*, 28(12): 1867-1872, doi: 10.1002/ptr.5219.
- Li, X.J., Li, Z.G., Wang, X., Han, J.Y., Zhang, B., Fu, Y.J., Zhao, C.J. (2016). Application of cavitation system to accelerate aqueous enzymatic extraction of seed oil from *Cucurbita pepo* L. and evaluation of hypoglycemic effect. *Food Chem*, 212: 403-410, doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.185.
- Manzoor, M., Anwar, F., Ashraf, M., Alkharfy, K.M. (2012). Physico-chemical characteristics of seed oils extracted from different apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties from Pakistan. *Grasas Y Aceites*, 63(2): 193-201, doi: 10.3989/gya.095011.
- Meru, G., Fu, Y., Leyva, D., Sarnoski, P., Yagiz, Y. (2018). Phenotypic relationships among oil, protein, fatty acid composition and seed size traits in *Cucurbita pepo*. *Sci Horti*, 233: 47-53, doi: 10.1016/j.scienta.2018.01.030.
- Morittu, V.M., Musco, N., Mastellone, V., Bonesi, M., Britti, D., Infascelli, F., Loizzo, M.R., Tundis, R., Sicari, V., Tudisco, R., Lombardi, P. (2019). In vitro and in vivo studies of *Cucurbita pepo* L. flowers: chemical profile and bioactivity. *Nat Prod Res*, 30: 1-5, doi: 10.1080/14786419.2019.1672067.
- Nafis, A., Kasrati, A., Jamali, C. A., Custódio, L., Vitalini, S., Iriti, M., Hassani, L. (2020). A Comparative study of the in vitro antimicrobial and synergistic effect of essential oils from *Laurus nobilis* L. and *Prunus armeniaca* L. from Morocco with antimicrobial drugs: New approach for health promoting products. *Antibiotics*, 9(4): 140, doi: 10.3390/antibiotics9040140.
- Naik, D.G., Dandge, C.N., Rupanar, S.V. (2011). Chemical examination and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Gymnema sylvestre* R. Br. leaves. *J Essent Oil Res*, 23(3): 12-19, doi: 10.1080/10412905.2011.9700451.
- Nourmohammadi, E., SadeghiMahoonak, A., Alami, M., Ghorbani, M. (2017). Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. *Int J Food Prop*, 20(12): 3244-3255, doi: 10.1080/10942912.2017.1283516.
- Preuss, H.G., Echard, B., Enig, M., Brook, I., Elliott, T.B. (2005). Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol Cell Biochem*, 272(1-2): 29-34, doi: 10.1007/s11010-005-6604-1.
- Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E., Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem*, 95: 664-671, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.049.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

- decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26: 1231-1237, doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3.
- Seidel, V., Taylor, P.W. (2004). In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 23:613-619, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2003.11.008.
- Sener, B., Orhan, I., Ozcelik, B., Kartal, M., Aslan, S., Ozbilen, G. (2007). Antimicrobial and antiviral activities of two seed oil samples of *Cucurbita pepo* L. and their fatty acid analysis. *Natural Product Communications*, 2(4): 395-398.
- Sharma, S., Satpathy, G., Gupta, R.K. (2014). Nutritional, phytochemical, antioxidant and antimicrobial activity of *Prunus armenicus*. *J Pharmacogn Phytochem*: 3(3), 23-28.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16: 144-158.
- Sójka, M., Kolodziejczyk, K., Milala, J., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S., Baron, A. (2015). Composition and properties of the polyphenolic extracts obtained from industrial plum pomaces. *J Funct Foods*, 12: 168-178, doi: 10.1016/j.jff.2014.11.015.
- SPSS, (2011). Statistical Package, SPSS for Windows, Ver. 20.0, Chicago.
- Sun, C.Q., O'Connor, C.J., Robertson, A.M. (2003). Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 36:9-17, doi: 10.1016/S0928-8244(03)00008-7.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9): 1199-1218, doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003.
- Tomas-Menor, L., Morales-Soto, A., Barrajon-Catalán, E., Roldán-Segura, C., Segura-Carretero, A., Micol, V. (2013). Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species. *Food Chem Toxicol*, 55: 313-322, doi: 10.1016/j.fct.2013.01.006.
- Türkmen, Ö., Özcan, M.M., Seymen, M., Paksoy, M., Uslu, N., Fidan, S. (2017). Physico-chemical properties and fatty acid compositions of some edible pumpkin seed genotypes and oils. *J Agroalimnet Processes Technol*, 23(4): 229-235.
- USP, (1995). The U.S. Pharmacopeia National Formulary. USP 23 NF 18, 1755 s.
- Xue, J., Davidson, P.M., Zhong, Q. (2013). Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. *J Agric Food Chem*, 61(51): 12720-12726, doi: 10.1021/jf4043437.
- Yadav, A.K., Pal, A., Dubey, A.M. (2018). Experimental studies on utilization of *Prunus armeniaca* L. (wild apricot) biodiesel as an alternative fuel for CI engine. *Waste and Biomass Valorization*, 9(10): 1961-1969, doi: 10.1007/s12649-017-9935-8.
- Zheng, C.J., Yoo, J.S., Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y.H., Kim, W.G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acid. *FEBS Lett*, 579:5157-5162, doi: 10.1016/j.febslet.2005.08.028.
- Zhou, B., Wang, Y., Kang, J., Zhong, H., Prenzler, P.D. (2016). The quality and volatile-profile changes of Longwangmo apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel oil prepared by different oil-producing processes. *Eur J Lipid Sci Technol*, 118(2), 236-243, doi: 10.1002/ejlt.201400545.

COMPARISON OF SOME PROPERTIES OF BUTTER OIL PRODUCED FROM CULTURED AND UNCULTURED BUTTER AT DIFFERENT TEMPERATURES

Tekin Demir, Seval Andiç*

University of Van Yüzüncü Yıl, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Van, Turkey

Received / Geliş: 12.10.2020; Accepted / Kabul: 05.04.2021; Published online / Online baskı: 19.04.2021

Demir, T., Andiç, S. (2021). Comparison of some properties of butter oil produced from cultured and uncultured butter at different temperatures. *GIDA* (2021) 46(3) 621-633 doi: 10.15237/gida.GD20118

Demir, T., Andiç, S. (2021). Kültürlü ve Kültürsüz Tereyağlarından Farklı Sıcaklıklarda Üretilen Sadeyağların Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması. *GIDA* (2021) 46(3) 621-633 doi: 10.15237/gida.GD20118

ABSTRACT

This study objective was to determine the effect of the use of culture and temperature applications in butter production on some properties of butter oil produced from these butter. Cultured (Group 1) and uncultured (Group 2) butter were processed into butter oil at 60, 90, and 120°C and were stored at +4°C for 60 days. Analyses revealed that the acidity, water activity, thiobarbituric acid cholesterol, lipolysis values and the yeast-mold and lipolytic microorganism counts of butter oil samples were lower than in the corresponding butter samples. At the end of the storage period, for both groups, the peroxide values of the butter oils produced at 60 and 90°C were lower than those of the counterpart butters, while the butter oils processed at 120°C had higher peroxide values. Raw matter, production temperature and storage time generally had a significant effect on the analyzed properties of butter oil.

Keywords: Butter, butter oil, cholesterol, lipolysis, oxidation

KÜLTÜRLÜ VE KÜLTÜRSÜZ TEREYAĞLARINDAN FARKLI SICAKLIKLARDA ÜRETİLEN SADEYAĞLARIN BAZI ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZ

Bu çalışmada, tereyağı üretiminde kültür kullanımının ve farklı sıcaklık uygulamalarının bu tereyağlarından üretilen sadeyağların bazı özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kültür eklenen (kültürlü - Grup 1) ve kültür eklenmeyen (kültürsüz - Grup 2) kremalardan üretilen tereyağları, 60, 90 ve 120°C'de sadeyağa işlenmiş ve +4°C'de 60 gün depolanmıştır. Analiz sonuçları, her iki grup tereyağı örneğinde de asitlik, su aktivitesi, tiyobarbitürik asit (TBA), kolesterol, lipoliz değerleri ile maya ve küf ve lipolitik mikroorganizma sayılarının hammadde tereyağlarına göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Depolama sonunda her iki grupta da 60 ve 90°C'de üretilen sadeyağların peroksit değerleri aynı hammaddeden üretilen tereyağlarının peroksit değerlerinden daha düşükken, 120°C'de işlenen sadeyağların peroksit değerleri üretildiği tereyağlarının peroksit değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur. Hammadde, üretim sıcaklığı ve depolama süresi sadeyağın incelenen özellikleri üzerinde genellikle önemli bir etki yapmıştır.

Anahtar kelimeler: Tereyağı, sadeyağ, kolesterol, lipoliz, oksidasyon

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ sevalandic@yyu.edu.tr,

☎ (+90) 432 225 1727 / 28187

☎ (+90) 432 225 1730

Tekin Demir; ORCID no: 0000-0002-3813-1693

Seval Andiç; ORCID no: 0000-0002-8306-0222

INTRODUCTION

Milk consists of a polydisperse structure; lactose, minerals, and vitamins exist in solution in milk serum, while proteins are found in colloidal form, and milk oil is an emulsion. However, milk is not comprised merely of a simple oil emulsion system in water; rather, fat globules found in emulsion form in milk serum possess a very complex membrane. The process of churning breaks down a substantial portion of these membrane structures, concentrating the milk fat and thus producing butter (Jenness, 1988).

Butter is a water emulsion in oil, possessing a solid consistency that can be produced from milk, yogurt, or cream (Spreer, 1998). Although a large portion of milk serum is removed during butter production, a certain amount of serum remains in the butter structure. The amount of water found in butter is limited to a maximum of 16% (Turkish Food Codex, 2005, Notification No. 2005/19). Although the water content of butter, which contains milk fat in a concentrated form, is much lower than in milk, butter nonetheless constitutes an ideal environment for microbial activity due to its high water activity (Fındık and Andiç, 2017). Thus, in many countries, storage stability is increased by processing butter into butter oil, which has much lower water content than the former, using traditional methods. In Turkey, butter oil is known as “sadeyağ” and as “maslee” or “samn” elsewhere in the Middle East, while in Ethiopia and India it is called “ghee”. Its other names include “roghan” in Iran, “samin” in Sudan, “samna” in Egypt, and “samuli” in Uganda. According to the International Dairy Federation (IDF) standards, butter oil is defined containing at least 99.3% milk fat; this requirement increases to 99% for the Turkish Food Codex (IDF, 1997; Turkish Food Codex, 2005; Dhurvey et al., 2012; Fındık and Andiç, 2017; Gemechu and Tola, 2017).

Butter oil is obtained by applying high heat to milk, cream, or butter, resulting in the removal of most of the buttermilk and solid matter phases; the amount and duration of heat applied during the production process vary by region (Sserunjogi et al., 1998; Fındık and Andiç, 2017). Since there

are no standards pertaining to raw ingredients or production techniques for the production of butter oil, latter properties also vary. Studies have shown that processing butter into butter oil offers a number of advantages as well as disadvantages. For example, butter oil has been reported to have lower water activity, cholesterol, and microbial counts than butter, but higher fat content. Butter oil has been found to have lower cholesterol levels compared to butter (Özkanlı and Kaya, 2007; Andiç and Fındık, 2017), a noteworthy point considering that the health implications of the cholesterol content of dairy products remain a subject of intense debate. Depending on the processes and storage conditions involved, cholesterol oxidation products may also be formed in butter and butter oil (Sander et al., 1988; Sieber, 2005); these oxidation products may have physiologically harmful effects (Osada et al., 1993; Guardiola et al., 1996). However, high temperatures applied during the production of butter oil have been purported to cause the formation of cholesterol oxidation products, which studies have determined to occur at temperatures of 150 °C and above (Nourroz-Zadeh and Appelqvist; 1988; Seçkin and Metin, 2005; Sieber, 2005).

One study reported that Sprague-Dawley rats who had 5% and 10% ghee added to their diets for two weeks to 2 months did not have exhibit statistically significant changes in serum total cholesterol and triglyceride levels (Dwivedi et al., 2002). In another study, no significant change was observed in serum cholesterol levels in Fischer inbred rats whose diets were supplemented with 10% ghee for four weeks, in that study, there was no change in levels of liver microsomal lipid peroxidation, a known factor in cardiovascular diseases and cancer (Sharma et al., 2010).

Butter oil is mainly processed from butter, with the heat treatment (Mehta, 2006; Dhurvey et al., 2012; Fındık and Andiç, 2017; Gosewade et al., 2017). Therefore, the extent to which the raw butter properties and production temperature affect those of the resulting butter oil is a topic of primary importance. There are a few study investigating the effects of production

temperatures on the properties of butter oil. Mor et al. (2018) reported that, no significant effect of ripening of cream and clarification temperature was observed on color value of ghee samples. In previous studies, it was observed that peroxide and thiobarbituric acid values increased in parallel with the increase in the temperatures applied post production (Kaya, 2000; Özkanlı and Kaya 2007). Previous studies have reported the results of analyses carried out to determine the properties of butter oil. However, the number of studies examining the effects of raw butter's properties and production temperature on the properties of butter oil is limited. The present study thus aimed to determine the effects of different temperatures (60, 90, and 120°C) applied during production as well as the use of culture in raw butter production on some properties of butter.

MATERIALS AND METHODS

Materials

A cream containing 40% fat was used for the production of butter. The cream was divided into two parts for the two different groups. The first group cream was pasteurized for 1 minute at 85°C and after cooling to 21°C was inoculated with a starter culture (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*) at 1%. Group 2 cream was used without being pasteurized and without the addition of starter culture. Both groups of cream were matured at 21°C for 12 hours and then churned. The two groups of butter obtained were then divided into three parts each, to be processed into butter oil at 60, 90, and 120°C. The butters and butter oils produced from them at 3 different temperatures were stored at +4°C for 60 days; the samples were analyzed at the beginning, 30th and 60th days of storage. The study was carried out with two replications and two parallels for each analysis.

Methods

Chemical Analyses

The fat and dry matter contents of the butters and the butter oils were determined using the International Organization for Standardization method (ISO, 2003). An AquaLAB LITE brand device (Decagon Devices, Inc., Washington,

USA) was used to determine the water activity values. The acidity values of the samples were determined according to the methods given in ISO (2012) and lipolysis (acid degree value) values were measured as per IDF (1991). Peroxide values were determined using the method described by Egan et al. (1981), while cholesterol values were evaluated according to the method of Searcy and Bergquist (1960).

For thiobarbituric acid analysis, sample absorbance values were read against blanks (Egan et al., 1981). Readings were taken according to the method described by Kristensen et al. (2001).

Microbiological Analyses

Mold-yeast and lipolytic microorganism counts were performed for the butter and butter oil samples. For this purpose, 10 g of each sample was taken and homogenized in 90 mL of 40°C physiological solutions. For mold-yeast counts, Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany) was used, with pH adjusted to 3.5, while for lipolytic microorganism counts Tributyrin Agar (TBA) (Merck, Darmstadt, Germany) was used. The Petri dishes were incubated for 7 days at 21°C for mold-yeast counts and 3 days at 30°C for lipolytic microorganisms. Logarithmic transformation was applied to the microorganism counts obtained as a result of incubation.

Determination of Free Fatty Acids by Gas Chromatography

The QP 2010 Ultra SHIMADZU brand GC-MS device was used for the analysis of free fatty acids. One g of sample was taken and mixed with 3 g of anhydrous sodium sulfate. Next, 0.3 ml of sulfuric acid (2.5 mol/L) and 0.5 mg/mL from 1 mL of internal standards (C:5 and C:13) were added. The mixture was extracted three times with 3 ml of ether/heptane (1:1) and the solvent was then transferred to a separate tube. Before the addition of the fat sample, the aminopropyl column was conditioned with 10 mL of heptane. The solvent was then passed through the aminopropyl column and the eluant received was passed through the same column for a second time to hold free fatty acids in the column. Neutral lipids were removed

from the column by passing 10 mL of ether/heptane (1:1) through it. Free fatty acids were eluted with diethyl ether containing 0.3 mL/mL formic acid and injected directly into the Gas Chromatography device (De Jong and Badings, 1990).

The injector temperature was 250°C in split mode (1:10). The initial oven temperature (60 °C) increased to 240°C at 10 °C/min and was maintained for 45 min. Thermo Scientific FFA Capillary column (260x298P L: 30 m x 0.530 mm, Film thickness: 0.25 µm, Thermo Scientific Cheshire, UK) was used in the separation of FFAs. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 2.6 mL/min.

Statistical Analyses

All data were subjected to variance analysis and differences between means were evaluated by Duncan multiple range test (significance $P < 0.05$) using the SPSS software (1999, 2000). To gain insight into the structure of the data set, principal component analysis (PCA) was performed (Piggott and Sharman, 1986).

RESULTS AND DISCUSSION

The dry matter values for all butter oil samples exceeded 99 g/100 g. The fat values of the butter oil samples increased with respect to those of the raw butter samples regardless of the fat content latter from which the butter oils were derived (Table 1). However, the fat values of the butter oils produced at 60°C remained below the minimum value of 99% as specified by the Turkish Food Codex for butter oil; the fat values of butter oils produced at 90 and 120°C were above 99%. These results are consistent with values reported in the literature (Sserunjogi, Abrahamsen and Narvhu, 1998; Findık and Andıç, 2017). The differences between the two groups of butter oils in fat and dry matter values were statistically insignificant ($P > 0.05$).

Comparing water activity values, lower values were observed for the butter oil samples than for their butter samples derived from the same raw ingredients (Table 1). Both butter oil sample groups showed decreased water activity values as

a result of the high temperatures applied during production. Accordingly, the lowest water activity values for both groups were found in the butter oils produced at 120°C in both groups. Water, which is in the structure of the food and has of 0.2-0.8 aw, is associated with primarily hydrogen bonds with neighboring water molecules and solute molecules. Water has 0.8-1 aw is usually hydrated in a monolayer on macro molecules such as proteins (Fennema, 1996). Butter oil samples produced at 120 °C generally have lower dry matter (Table 1) and total free fatty acid (Table 3) values than butter oil produced at 60 and 90 °C and butter samples. Therefore aw of butter oil samples produced 120 °C is lower than butter and butter oil produced at 60 and 90 °C. The temperatures applied during production were determined to have a significant effect ($P < 0.05$) on the water activity values of the samples (Table 1).

Butter oils produced at different temperatures from cultured and uncultured butter exhibited lower cholesterol values than their raw ingredients. The values obtained were consistent with those reported in the literature (Al-Khalifah and Al-Kahtani, 1993; Seçkin et al., 2005; Findık and Andıç 2017). The decreases observed in both butter oil groups correlated with increased production temperatures and the differences between the samples cholesterol values were statistically significant ($P < 0.05$). Some of the cholesterol, which is in the milk fat, in the fat globule membrane and a complex with the protein, is separated from the butter structure together with the solid matter during the production of butter oil. As can be seen in Table 1, the maximum drymatter values are separated from the structure of butter oil samples produced at 120 °C. Accordingly, the lowest cholesterol values were obtained from this group of butter oil. The cholesterol values of butter oils produced from cultured butter were significantly higher than those of butter oils produced from uncultured butter ($P < 0.05$).

Comparison of some properties of butter oil

Table 1. Result of some chemical analysis of butter and butter oil

	Sample no	Storage Time (Days)		
		0	30	60
Drymatter (g/100 g)	1	79.54 ± 0.19 ^{Ba}	79.59 ± 0.28 ^{Ba}	79.60 ± 0.28 ^{Ba}
	2	99.72 ± 0.04 ^{Aa}	99.53 ± 0.17 ^{Aa}	99.53 ± 0.16 ^{Aa}
	3	99.59 ± 0.09 ^{Aa}	99.58 ± 0.07 ^{Aa}	99.58 ± 0.07 ^{Aa}
	4	99.55 ± 0.12 ^{Aa}	99.53 ± 0.12 ^{Aa}	99.53 ± 0.12 ^{Aa}
	5	78.25 ± 0.44 ^{Ca}	78.38 ± 0.14 ^{Ca}	78.38 ± 0.14 ^{Ca}
	6	99.60 ± 0.08 ^{Aa}	99.60 ± 0.03 ^{Aa}	99.60 ± 0.03 ^{Aa}
	7	99.67 ± 0.01 ^{Aa}	99.65 ± 0.03 ^{Aa}	99.64 ± 0.03 ^{Aa}
	8	99.45 ± 0.01 ^{Ab}	99.60 ± 0.03 ^{Aa}	99.59 ± 0.03 ^{Aa}
Fat (g/100 g)	1	78.33 ± 0.58 ^{Ba}	78.33 ± 0.57 ^{Ba}	78.33 ± 0.57 ^{Ba}
	2	98.96 ± 0.36 ^{Aa}	98.96 ± 0.36 ^{Aa}	98.96 ± 0.36 ^{Aa}
	3	99.17 ± 0.36 ^{Aa}	99.17 ± 0.36 ^{Aa}	99.17 ± 0.36 ^{Aa}
	4	99.38 ± 0.00 ^{Aa}	99.38 ± 0.00 ^{Aa}	99.38 ± 0.00 ^{Aa}
	5	77.33 ± 0.58 ^{Ca}	77.33 ± 0.57 ^{Ca}	77.33 ± 0.57 ^{Ca}
	6	98.96 ± 0.36 ^{Ac}	98.96 ± 0.37 ^{Aa}	98.96 ± 0.36 ^{Aa}
	7	99.17 ± 0.36 ^{Aa}	99.17 ± 0.36 ^{Aa}	99.17 ± 0.36 ^{Aa}
	8	99.17 ± 0.36 ^{Aa}	99.17 ± 0.36 ^{Aa}	99.17 ± 0.36 ^{Aa}
Water Activity (a _w)	1	0.98 ± 0.04 ^{Aa}	0.96 ± 0.01 ^{Aa}	0.96 ± 0.01 ^{Aa}
	2	0.77 ± 0.01 ^{Ca}	0.76 ± 0.01 ^{Ca}	0.76 ± 0.01 ^{Ca}
	3	0.72 ± 0.02 ^{Da}	0.73 ± 0.02 ^{Da}	0.72 ± 0.02 ^{Da}
	4	0.50 ± 0.02 ^{Ga}	0.50 ± 0.01 ^{Ga}	0.49 ± 0.01 ^{Ga}
	5	0.93 ± 0.02 ^{Ba}	0.92 ± 0.01 ^{Ba}	0.92 ± 0.02 ^{Ba}
	6	0.67 ± 0.10 ^{Ea}	0.64 ± 0.01 ^{Ea}	0.65 ± 0.03 ^{Ea}
	7	0.56 ± 0.01 ^{Fa}	0.55 ± 0.01 ^{Fa}	0.55 ± 0.03 ^{Fa}
	8	0.48 ± 0.01 ^{Ga}	0.48 ± 0.01 ^{Ha}	0.49 ± 0.01 ^{Ga}
Cholesterol (mg/100 g fat)	1	303.26 ± 3.04 ^{Aa}	300.47 ± 2.55 ^{ABa}	300.79 ± 4.82 ^{Aa}
	2	292.86 ± 7.40 ^{Ba}	293.60 ± 2.33 ^{BCa}	291.72 ± 3.47 ^{Ba}
	3	289.27 ± 1.06 ^{Ba}	287.03 ± 6.50 ^{Ca}	287.31 ± 2.49 ^{Ba}
	4	255.79 ± 0.68 ^{Da}	255.79 ± 1.33 ^{Ea}	256.69 ± 1.69 ^{Da}
	5	302.61 ± 2.44 ^{Aa}	302.66 ± 1.38 ^{Aa}	302.14 ± 5.52 ^{Aa}
	6	291.36 ± 1.09 ^{Ba}	291.33 ± 2.47 ^{Ca}	291.03 ± 1.18 ^{Ba}
	7	277.06 ± 4.06 ^{Ca}	275.12 ± 8.32 ^{Da}	276.90 ± 1.18 ^{Ca}
	8	236.82 ± 1.78 ^{Ea}	235.28 ± 3.91 ^{Fa}	236.89 ± 0.99 ^{Ea}
Acidity Value (mL/100 g)	1	0.33 ± 0.02 ^{Ac}	0.45 ± 0.04 ^{Ab}	0.59 ± 0.02 ^{Aa}
	2	0.05 ± 0.01 ^{Cb}	0.07 ± 0.01 ^{Cb}	0.10 ± 0.01 ^{Ca}
	3	0.04 ± 0.01 ^{Ca}	0.05 ± 0.01 ^{Ca}	0.07 ± 0.02 ^{DCa}
	4	0.04 ± 0.01 ^{Ca}	0.04 ± 0.01 ^{Ca}	0.06 ± 0.01 ^{Da}
	5	0.24 ± 0.02 ^{Bb}	0.33 ± 0.06 ^{Ba}	0.40 ± 0.04 ^{Ba}
	6	0.05 ± 0.01 ^{Ca}	0.06 ± 0.01 ^{Ca}	0.06 ± 0.01 ^{DCa}
	7	0.03 ± 0.01 ^{Ca}	0.04 ± 0.01 ^{Ca}	0.04 ± 0.01 ^{Da}
	8	0.03 ± 0.01 ^{Ca}	0.03 ± 0.01 ^{Ca}	0.04 ± 0.01 ^{Da}

^{a,b,c}: Means within a row and each category followed by the different letters are significantly differ ($P < 0.05$).

^{A,B,C,D,E,F}: Means within a column and each category followed by the different letters are significantly differ ($P < 0.05$).

1: cultured butter, 2: butter oil produced cultured butter at 60°C, 3: butter oil produced cultured butter at 90°C, 4: butter oil produced cultured butter at 120°C, 5: uncultured butter, 6: butter oil produced uncultured butter at 60°C, 7: butter oil produced uncultured butter at 90°C, 8: butter oil produced uncultured butter at 120°C

The acidity values of butter and butter oil samples increased during the storage period; the changes in acidity levels observed in the butter samples were statistically significant ($P < 0.05$). Comparing the acidity levels of the butter samples, those of the butter samples made from cultured cream were significantly higher than those processed from uncultured cream at all stages of analysis ($P < 0.05$) (Table 1). For both groups, although the acidity values of butter oils produced at 60°C were greater than those produced at 90 and 120°C, the differences were mostly not statistically significant ($P < 0.05$) (Table 1). The acidity results obtained for the butter samples in our study were consistent with those determined by Çakmakçı et al. (2014). Sagdic et al. (2004) reported acidity values for butters obtained from goat, sheep, and cow's milk of 0.25, 0.23, and 0.24, respectively, similar to those found for uncultured butters in the present study but lower than the acidity values of the cultured butters in our study. Regarding the acidity levels of butter oils, our values were lower than those reported by Fındık and Andic (2017).

Peroxide values (PV), which correlate with hydroperoxides formed at the initial stage of oxidation, have been determined to be typically higher in butter oils than in the butters containing the same raw ingredients. The peroxide values of the butter samples processed from cultured cream and the resulting butter oils were found to generally have higher peroxide values than the butter and butter oils produced from uncultured cream at both the beginning and end of the storage period. This finding can be explained by the fact that the oxidative stability of butter made from ripened cream using culture is lower than that of butter produced from uncultured cream (Spreer, 1998; Tavlaşlar-Hocalar, 2011). Significant increases were observed in all samples peroxide values as a result of storage (Table 2). In parallel with the high temperatures applied during butter oil production, the increase in PV values may be indicative of thermal oxidation (Nawar, 1996). Similar findings were reported by Özkanlı and Kaya (2007) for butter oils produced from pasteurized and non-pasteurized milk and by Senel et al. (2011) for Yayık butter produced from cow, sheep and goat yoghurt. The PV values of

our butter and butter oil samples were as a rule lower than those reported by Fındık and Andic (2017) for butter samples obtained at local markets and the butter oils produced from them. The PV values of all samples tested herein were below the allowed limit of 10 meq O₂/kg (Egan et al., 1981).

Thiobarbituric acid (TBA) testing is a measure of the amount of malondialdehyde in the samples that provides information about the secondary products of oxidation. According to one view, TBA is only malondialdehyde specific and is comprised of fatty acids containing at least three unsaturated bonds in malondialdehyde (Dahle et al., 1962). Another view holds that TBA is not only malondialdehyde specific and may also react with other aldehydes, browning reaction products, protein and sugar fragmentation products, and amino acids (Janero, 1969). The TBA values of all samples increased significantly during storage ($P < 0.05$) (Table 2). Similar results were reported by Özkanlı and Kaya (2007) for butter oil and Şimşek (2011) for butter. As with peroxide values, TBA values were higher in the butter produced from cultured cream than in butter produced from non-cultured cream. At the end of the storage period, the highest TBA values obtained were for the butter oils produced from the cultured butter at 60°C (Table 2). The TBA values of the butter oils analyzed in this study were consistent with the TBA values reported by Asha et al. (2015) for butter oil stored at temperatures of 6, 32, and 60°C for 21 days.

The acid degree values (ADV) for the butter oils and the butters from which they were derived were determined to differ significantly between the beginning and end of the storage period ($P < 0.05$), with the values for all samples increasing during storage. Although the changes in ADV were not statistically significant during the storage period of butter oil produced from the cultured butter, for the butter oil made from uncultured butter, the changes observed in ADV during the storage period were generally statistically significant ($P < 0.05$). The ADV results obtained for the butter oils in our study were similar to those reported by Yadav and Srinivasan (1985) for butter oil. With regard to differences in ADV

Comparison of some properties of butter oil

between butter and butter oil, the findings of Findık and Andiç (2017) were consistent those obtained in our study. Nonetheless, our ADV

results in absolute terms were lower than those reported in their study.

Table 2. Results of lipolysis values, and microorganism counts of butter and butter oil samples

	Sample no	Storage Time (Days)		
		0	30	60
Peroxide value (meqO ₂ /kg fat)	1	0.92 ± 0.01 Cc	1.52 ± 0.01 Bb	1.67 ± 0.11 BAA
	2	0.91 ± 0.04 Cc	1.12 ± 0.01 Eb	1.27 ± 0.07 Ca
	3	1.15 ± 0.04 Bc	1.24 ± 0.01 Db	1.57 ± 0.02 Ba
	4	1.57 ± 0.02 Ac	1.70 ± 0.01 Ab	1.76 ± 0.01 Aa
	5	0.74 ± 0.49 Db	1.42 ± 0.03 Ca	1.30 ± 0.09 Ca
	6	0.88 ± 0.03 Cb	0.84 ± 0.04 Gb	1.14 ± 0.05 Da
	7	0.91 ± 0.01 Cb	0.96 ± 0.01 Fb	1.10 ± 0.05 Da
	8	1.23 ± 0.11 Bc	1.45 ± 0.03 Cb	1.62 ± 0.07 Ba
Thiobarbituric acid (TBA mg Malondialdehyde /kg sample)	1	0.13 ± 0.01 Ac	0.17 ± 0.01 Ab	0.20 ± 0.01 Aa
	2	0.04 ± 0.01 Cc	0.06 ± 0.01 Cb	0.09 ± 0.01 Ba
	3	0.04 ± 0.01 Cb	0.06 ± 0.01 Cba	0.07 ± 0.01 CDEa
	4	0.03 ± 0.01 Cc	0.04 ± 0.01 Cb	0.05 ± 0.01 Ea
	5	0.11 ± 0.01 Bc	0.15 ± 0.01 Bb	0.19 ± 0.01 Aa
	6	0.04 ± 0.01 Cc	0.06 ± 0.01 Cb	0.08 ± 0.01 CBa
	7	0.04 ± 0.01 Cc	0.05 ± 0.01 Cb	0.07 ± 0.01 CDa
	8	0.02 ± 0.01 Cc	0.03 ± 0.01 Cb	0.05 ± 0.01 DEa
Lipolysis (ADV meq/100 g fat)	1	1.70 ± 0.08 Ab	1.84 ± 0.07 Aab	1.96 ± 0.11 Aa
	2	0.31 ± 0.07 Db	0.38 ± 0.05 DEb	0.55 ± 0.08 DCa
	3	0.36 ± 0.03 Dc	0.43 ± 0.02 Db	0.52 ± 0.03 DEa
	4	0.31 ± 0.02 Db	0.46 ± 0.15 Dba	0.62 ± 0.05 DCa
	5	1.45 ± 0.07 Ba	1.54 ± 0.07 Ba	1.68 ± 0.04 Ba
	6	0.55 ± 0.11 Ca	0.62 ± 0.10 Ca	0.66 ± 0.10 Ca
	7	0.34 ± 0.01 Da	0.40 ± 0.03 DEa	0.41 ± 0.07 FEa
	8	0.24 ± 0.04 Da	0.27 ± 0.04 Ea	0.32 ± 0.04 Fa
Yeast-Mould (log ₁₀ CFU/g)	1	1.58 ± 0.06 Bb	1.74 ± 0.10 Bb	2.17 ± 0.07 Ba
	2	ND Ca	ND Ca	ND Ca
	3	ND Ca	ND Ca	ND Ca
	4	ND Ca	ND Ca	ND Ca
	5	3.08 ± 0.03 Ac	5.66 ± 0.03 Ab	7.05 ± 0.05 Aa
	6	ND Ca	ND Ca	ND Ca
	7	ND Ca	ND Ca	ND Ca
	8	ND Ca	ND Ca	ND Ca
Lipolytic Microorganisms (log ₁₀ CFU/g)	1	4.66 ± 0.04 Ba	4.69 ± 0.04 Ba	4.61 ± 0.06 Ba
	2	2.54 ± 0.06 Cb	2.94 ± 0.05 Da	3.05 ± 0.07 Da
	3	ND Ec	2.17 ± 0.15 Eb	3.57 ± 0.05 Ca
	4	2.18 ± 0.15 Db	3.28 ± 0.06 Ca	3.54 ± 0.07 Cc
	5	6.98 ± 0.03 Ab	7.12 ± 0.04 Aa	6.72 ± 0.07 Ac
	6	ND Ea	ND Fa	ND Fa
	7	ND Eb	ND Fb	2.59 ± 0.05 Ea
	8	ND Ea	ND Fa	ND Fa

a,b,c: Means within a row and each category followed by the different letters are significantly differ ($P < 0.05$).

A,B,C,D,E,F: Means within a column and each category followed by the different letters are significantly differ ($P < 0.05$). ND: Not detected; CFU: Colony forming unit.

1: cultured butter, 2: butter oil produced cultured butter at 60°C, 3: butter oil produced cultured butter at 90°C, 4: butter oil produced cultured butter at 120°C, 5: uncultured butter, 6: butter oil produced uncultured butter at 60°C, 7: butter oil produced uncultured butter at 90°C, 8: butter oil produced uncultured butter at 120°C

Mold and yeast counts for both butter types were observed to increase significantly over the storage period ($P < 0.05$) (Table 2). The butter samples produced from cultured cream were statistically significantly lower with respect to mold and yeast counts than the butter samples processed from uncultured cream at the beginning and end of the storage period ($P < 0.05$). The process of pasteurization, applied to the cream prior to culturing, was effective. Neither mold nor yeast was detected in any of the butter oil samples.

Lipolytic microorganism counts were significantly higher in both groups of butter than in the butter oils produced from those them ($P < 0.05$). In both types of butter, the lipolytic microorganism counts decreased over the course of the storage period. These decreases were significant in the butter samples produced from uncultured cream ($P < 0.05$), while the decreases in the butter samples produced from cultured cream were not (Table 2). In samples of butter oil produced from cultured butter, the lipolytic microorganism counts were detectable, whereas lipolytic microorganisms could not be detected in any of sample except sample 7 in the butter oils, produced from uncultured butter. Similar results were reported by Findık and Andıç (2017). The ability of some microorganisms to survive the thermal processes applied during the processing of butter oil can be attributed to the oil protecting microorganisms against the effect of the heat process and to the presence of water activity in butter oil (Ray and Bhunia, 2004). For this reason, the lipolytic microorganism counts for the butter oils produced from butter processed from cultured cream, which had higher water activity values, was greater in comparison with the other group.

The short, medium and long-chain fatty acid quantities of the samples increased throughout storage; these increases were for the most part significant ($P < 0.05$) (Table 3). For both groups, the short, medium, and long-chain free fatty acid levels of the butter samples were overall significantly higher than those of the corresponding butter oils ($P < 0.05$). This finding is explained by the lower acidity and water activity

levels of the butter oils with respect to the butter samples, due to a monomolecular reaction between water and glycerides in lipids and the spontaneous and autocatalytic breakdown of esters and free acids in that environment. Secondly, as a result of the thermal processes applied, some of the lipase enzymes were inactivated, thus limiting both chemical and enzymatic hydrolysis (Nawar, 1996).

The differences between the total free fatty acid compounds of the butters and those of the butter oils processed from them were statistically significant for all periods of analysis ($P < 0.05$) (Table 3). In addition, the various temperatures used in production were determined to have a significant ($P < 0.05$) effect on the total free fatty acid content of butter oils in both groups. Similar results were reported by Iyer et al. (1967) for short, medium and long-chain free fatty acids. The total free fatty acid values for butter as determined in our study were consistent with those reported by Woo and Lindsay (1980) and Findık and Andıç (2017).

According to the principal component analysis results, principal components explained approximately 93.10% of the total variation on 0th day of storage (first component 84.90%, second component 8.30%), approximately 92.90% on 30th day of storage (first component 82.40%, second component 10.40%) and approximately 90.30% on the 60th day of storage (first component 80.10%, second component 10.20%) (Figure 1).

There was a strong positive correlation between dry matter and fat throughout the storage period, and a strong negative correlation between dry matter, fat and water activity, mold and yeast counts, lipolytic microorganism counts. Again, for all analysis periods, there were strong positive correlations between ADV, total free fatty acids, and acidity, and between water activity, mold and yeast counts, and lipolytic microorganism counts. While a strong negative correlation between PV and TBA was observed at the beginning of storage, this negativity had decreased toward the end of the storage period.

Comparison of some properties of butter oil

Table 3. Result of free fatty acids content of butter and butter oil

	Sample no	Storage Time (Days)		
		0	30	60
Short Chain Free Fatty Acids (mg/kg)	1	50.69 ± 1.76 ^{Ac}	316.01 ± 1.85 ^{Bb}	686.07 ± 1.53 ^{Aa}
	2	26.18 ± 0.95 ^{Cb}	27.08 ± 1.30 ^{DEb}	31.12 ± 0.94 ^{Ca}
	3	27.44 ± 2.60 ^{CBb}	35.78 ± 0.75 ^{Ca}	37.18 ± 1.81 ^{Ca}
	4	21.24 ± 0.96 ^{Db}	22.75 ± 0.95 ^{Eab}	24.38 ± 1.04 ^{Ca}
	5	52.45 ± 3.01 ^{Ac}	390.11 ± 8.44 ^{Ab}	599.30 ± 4.39 ^{Ba}
	6	27.57 ± 0.96 ^{CBc}	30.98 ± 1.02 ^{CDb}	33.44 ± 1.01 ^{Ca}
	7	30.16 ± 1.13 ^{Bc}	32.70 ± 0.95 ^{CDb}	35.52 ± 1.65 ^{Ca}
	8	29.26 ± 0.98 ^{CBc}	31.92 ± 0.71 ^{CDb}	33.79 ± 0.36 ^{Ca}
Medium Chain Free Fatty Acids (mg/kg)	1	294.02 ± 7.98 ^{Bc}	956.95 ± 12.09 ^{Ab}	2352.31 ± 19.61 ^{Aa}
	2	217.41 ± 3.02 ^{Cc}	264.99 ± 3.25 ^{Bb}	298.82 ± 6.14 ^{Ga}
	3	190.64 ± 1.21 ^{Ec}	207.57 ± 5.85 ^{Ca}	212.40 ± 5.32 ^{Da}
	4	191.17 ± 1.49 ^{Eb}	198.74 ± 2.42 ^{Ca}	202.33 ± 5.97 ^{Ha}
	5	307.16 ± 7.23 ^{Ac}	976.71 ± 7.25 ^{Ab}	1650.21 ± 15.71 ^{Ba}
	6	202.14 ± 3.66 ^{Dc}	275.56 ± 4.23 ^{Bb}	300.05 ± 7.53 ^{Ea}
	7	193.53 ± 1.79 ^{Ec}	199.56 ± 3.42 ^{Cb}	209.85 ± 1.35 ^{Fa}
	8	190.52 ± 6.76 ^{Eb}	201.95 ± 3.69 ^{Ca}	209.73 ± 4.42 ^{Ca}
Long Chain Free Fatty Acids (mg/kg)	1	4427.58 ± 81.32 ^{Ac}	5469.46 ± 42.92 ^{Ab}	8327.97 ± 85.30 ^{Aa}
	2	2726.63 ± 67.95 ^{Bc}	2896.27 ± 56.27 ^{Bb}	3825.82 ± 60.00 ^{Ca}
	3	2545.46 ± 66.11 ^{Cc}	2810.58 ± 65.74 ^{BCb}	3500.59 ± 63.39 ^{Da}
	4	2451.04 ± 31.87 ^{Cc}	2706.63 ± 40.94 ^{Cb}	3262.89 ± 41.78 ^{Da}
	5	4545.58 ± 68.13 ^{Ac}	5523.23 ± 68.95 ^{Ab}	7323.63 ± 71.93 ^{Ba}
	6	2224.14 ± 29.82 ^{Dc}	2391.34 ± 57.82 ^{DEb}	2686.78 ± 72.91 ^{Ca}
	7	2228.82 ± 35.20 ^{Dc}	2472.78 ± 57.80 ^{Db}	2735.11 ± 95.26 ^{Da}
	8	2184.90 ± 61.74 ^{Db}	2326.96 ± 57.77 ^{Eb}	2672.22 ± 65.64 ^{Da}
Total Free Fatty Acids (mg/kg)	1	4772.29 ± 79.04 ^{Bc}	6742.41 ± 32.77 ^{Ab}	11366.11 ± 55.41 ^{Aa}
	2	2970.23 ± 65.59 ^{Cc}	3188.35 ± 50.69 ^{Bb}	4155.77 ± 56.69 ^{Ca}
	3	2763.55 ± 62.64 ^{Dc}	3053.93 ± 60.03 ^{BCb}	3750.16 ± 66.04 ^{Da}
	4	2663.47 ± 30.99 ^{Dc}	2928.12 ± 39.16 ^{Cb}	3490.60 ± 36.46 ^{Ea}
	5	4905.19 ± 64.90 ^{Ac}	6762.29 ± 64.95 ^{Ab}	9573.14 ± 54.06 ^{Ba}
	6	2454.26 ± 25.35 ^{Ec}	2697.88 ± 56.28 ^{Db}	3020.27 ± 79.12 ^{Fa}
	7	2452.51 ± 26.49 ^{Ec}	2705.04 ± 57.89 ^{Db}	2980.48 ± 96.29 ^{Fa}
	8	2404.68 ± 56.76 ^{Eb}	2560.84 ± 54.76 ^{Eb}	2915.74 ± 62.98 ^{Fa}

^{a,b,c}: Means within a row and each category followed by the different letters are significantly differ ($P < 0.05$).

^{A,B,C,D,E,F,G}: Means within a column and each category followed by the different letters are significantly differ ($P < 0.05$).

1: cultured butter, 2: butter oil produced cultured butter at 60°C, 3: butter oil produced cultured butter at 90°C, 4: butter oil produced cultured butter at 120°C, 5: uncultured butter, 6: butter oil produced uncultured butter at 60°C, 7: butter oil produced uncultured butter at 90°C, 8: butter oil produced uncultured butter at 120°C

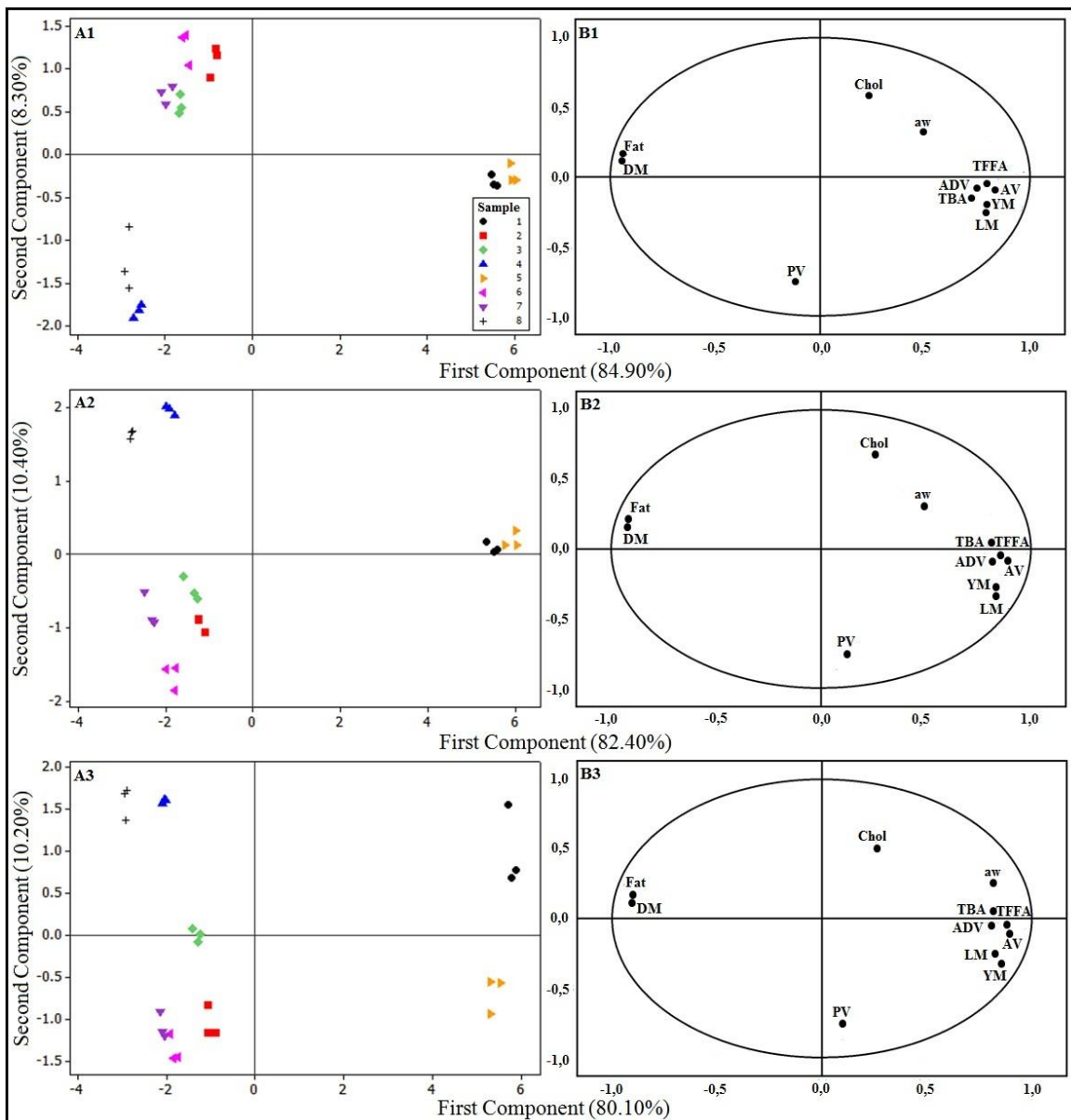


Fig. 1. PCA sample map (A1, A2, A3) and factors correlation circle (B1, B2, B3) of butter oil produced from cultured and uncultured butter at different temperatures with all chemical and microbiological characteristic. A1, B1: 0. day of storage; A2, B2: 30. day of storage; A3, B3: 60. day of storage.

ADV = acid degree value; AV = acidity value; a_w = water activity; Chol = cholesterol value; Fat = fat value; TFFA = total free fatty acids; YM = yeast-mould; PV = peroxide value; TBA = Thiobarbituric acid value; LM = lipolytic microorganism

CONCLUSION

Based on the results of the analyses, the ripening of the cream by using a starter culture, the different temperatures applied and the storage time were all determined to affect various properties of the butter oils. The temperatures

used in the production of butter oil were shown to significantly affect their fat, water activity, and cholesterol contents. In both groups, the lowest water activity and cholesterol contents and highest fat values were observed in butter oils processed at 120°C. The use of starter in butter

production and the different temperatures applied during its production significantly affected the PV values of the butter oils. The TBA values for all samples increased significantly over time. However, the different temperature levels used in production did not significantly affect the TBA values of butter oils. No mold or yeast was detected in any analysis period in any of the butter oil samples. However, the number of lipolytic microorganisms in Group 1 samples (Butter oil produced cultured butter) was higher than that of Group 2 samples (Butter oil produced uncultured butter) for all analysis periods. Pasteurizing the cream to be processed in butter and ripening it using a starter is especially necessary from the standpoint of microbiological quality. However, the results of the present study indicate that neither the use of a starter in the production of raw butter nor pasteurization was necessary since thermal processes were applied during the preparation of the butter oils.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of Van Yuzuncu Yil University (Van, Turkey) under number of FDK-2017-6331.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Tekin Demir contributed to the production of samples, methodology, data acquisition, formal analysis, writing-original draft of the article. Seval Andiç had supervising the course of the project and contributed to conceptualization, methodology, formal analysis, writing-original draft, writing-review and editing, visualization as a supervisor. The authors read and approved the final version of the article.

REFERENCES

Al-Khalifah, A., Al-Kahtani, H. (1993). Composition of ghee (Samn Barri's) from cow's and sheep's milk. *Food Chem.*, 46(4): 373-375, doi: 10.1016/0308-8146(93)90007-3.

Asha, A., Manjunatha, M., Rekha, R. M., Surendranath, B., Heartwin, P., Rao, J., Magdaline, E., Sinha, C. (2015). Antioxidant activities of orange peel extract in ghee (butter oil) stored at different storage temperatures. *J. Food Sci. Technol.*, 52(12): 8220-8227, doi: 10.1007/s13197-015-1911-3.

Çakmakçı, S., Gündoğdu, E., Dağdemir, E., Erdoğan, Ü. (2014). Investigation of the possible use of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) essential oil on butter stability. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 20(4): 533-539, doi: 10.9775/kvfd.2013.10550.

Dahle, L. K., Hill, E. G., Holman, R. T. (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys.*, 98(2): 253-261, doi: 10.1016/0003-9861(62)90181-9.

De Jong, C., Badings, H. T., (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13: 94-98, doi: 10.1002/jhrc.1240130204.

Dhurvey, Y. R., Kawtikwar, P. S., Sakarkar, D. M. (2012). Evaluation of physicochemical properties of cow ghee before and after hydrogenation. *Int. J. ChemTech Res.*, 4(1): 185-189.

Dwivedi, C., Crosser, A. E., Mistry, V. V., Sharma, H. M. (2002). Effects of dietary ghee (clarified butter) on serum lipids in rats. *J. Appl. Nutr.*, 52: 65-68.

Egan, H., Kirk, R. S., Sawyer, R., (1981). Oils and fats. In: *Pearson's Chemical Analysis of Foods*, Egan, H. (Ed.), Churchill Livingstone, Edinburg, pp. 534-539.

Fennema, O. R. (1996). Water and ice. In: *Food Chemistry*, Fennema, O. R. (Ed.), (3rd ed) Marcel Dekker Inc., New York, pp. 17-95.

Findık, O., Andiç, S. (2017). Some chemical and microbiological properties of the butter and the butter oil produced from the same raw material. *LWT*, 86: 233-239, doi: 10.1016/j.lwt.2017.08.002.

Gemechu, A. T., Tola, Y. B. (2017). Traditional butter and ghee production, processing and

- handling in Ethiopia: A review. *Afr. J. Food Sci.*, 11(4): 95-105, doi: 10.5897/AJFS2016.1544.
- Gosewade, S., Gandhi, K., Ranvir, S., Kumar, A., Lal, D. (2017). A study on the physico-chemical changes occurring in ghee (butter oil) during storage. *Indian J. Dairy Sci.*, 70(1): 81-88.
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P. B., Rafecas, M., Boatella, J. (1996) Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol.*, 34(2): 193-211, doi: 10.1016/0278-6915(95)00094-1.
- IDF (1997). Anhydrous milkfat, anhydrous butter oil or anhydrous butterfat, butter oil or butterfat, ghee: Standards of identity. FIL-IDF 68A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- ISO (2003). Butter-Determination of moisture, non-fat solids and fat contents. ISO 3727-3:2003 (IDF 80-3:2003).3.
- ISO (2012). Milk and milk products-Determination of the titratable acidity of milk fat. ISO/TS 22113:2012 (IDF/RM 204:2012).4.
- Iyer, M., Richardson, T., Amundson, C. H., Boudreau, A. (1967). Improved Technique for Analysis of Free Fatty Acids in Butteroil and Provolone Cheese. *J. Dairy Sci.*, 50(3): 285-291, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(67)87411-3.
- Janero, D. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 9(6): 515-540, doi: 10.1016/0891-5849(90)90131-2.
- Jenness, R. (1988). Composition of milk. In: *Fundamentals of dairy chemistry*, N. P. Wang, N. P. (Ed.), New York, the USA, pp. 1-39.
- Kristensen, D., Hansen, E., Arndal, A., Trinderup, R. A., Skibsted, L. H. (2001). Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. *Int. Dairy J.*, 11: 837-843, doi: 10.1016/S0958-6946(01)00105-4.
- Mehta, B. M. (2006). Ragi (*Eleusine coracana* L.) - a natural antioxidant for ghee (butter oil). *Int. J. Food Sci. Technol.*, 41 (Supplement 1): 86-89, doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01348.x.
- Nawar, W. W. (1996). Lipids. In: *Food chemistry*, Fennema, O. R. (chief ed.), New York, the USA, pp. 225-331.
- Nourooz-Zadeh, J., Appelqvist, L. A. (1988). Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Butter and Cheese. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65: 1635-1641, doi: 10.1007/BF02912568.
- Osada, K., Kodama, T., Yamada, K., Sugano, M. (1993). Oxidation of cholesterol by heating. *J. Agric. Food Chem.*, 41: 1198-1202, doi: 10.1021/jf00032a006.
- Özkanlı, O., Kaya, A. (2007). Storage stability of butter oil produced from sheep's non-pasteurized and pasteurized milk. *Food Chem.*, 100: 1026-1031, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.10.052.
- Piggott, J. R., Sharman, K. (1986). Methods to aid interpretation of multidimensional data. In: *Statistical Procedures in Food Research*, Piggott, J. R. (ed.), Elsevier Applied Science, London, the UK, pp. 181-233.
- Ray, B., A Bhunia, A. (2007). *Fundamental food microbiology*. New York, CRC Press, 663.
- Sagdic, O., Donmez, M., Demirci, M. (2004). Comparison of characteristic and fatty acid profiles of Traditional Turkish Yayik butters produced from goats', ewes' or cows' milk. *Food Control*, 15(6): 485-490, doi: 10.1016/j.foodcont.2003.07.003.
- Sander, B. D., Smith, D. E., Addis, P. B. (1988). Effects of Processing Stage and Storage Conditions on Cholesterol Oxidation Products in Butter and Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.*, 71: 3173-3178, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(88)79921-X.
- Searcy, R. L., Bergquist, L. M. (1960). A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 5: 102, doi: 10.1016/0009-8981(60)90035-8.
- Seçkin, A. K., Gursoy, O., Kinik, O., Akbulut, N. (2005). Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy

- products. *LWT*, 38(8): 909-915, doi: 10.1016/j.lwt.2004.09.011.
- Seçkin, A. K., Metin, M. (2005). The effect of process temperature and time on the occurrence of the products of cholesterol oxidation in butter. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40: 903-906, doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.01022.x.
- Senel, E., Atamer, M., Öztekin, F. S. (2011). The oxidative and lipolytic stability of Yayık butter produced from different species of mammals milk (cow, sheep, goat) yoghurt. *Food Chem.*, 127(1): 333-339, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.012.
- Sharma, H., Zhang, X., Dwivedi, C. (2010). The effect of *ghee* (clarified butter) on serum lipid levels and microsomal lipid peroxidation. *AYU*, 31(2): 134-140, doi: 10.4103/0974-8520.72361.
- Sieber, R. (2005). Oxidised cholesterol in milk and dairy products. *Int. Dairy J.*, 15(3): 191-206, doi: 10.1016/j.idairyj.2004.07.013.
- Sonia Mor, S., Sharma, V., Minz, P. S., Nain, N. 2018. Temperature and ripening of cream on color parameters of ghee. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 7(10): 30-43, doi: 10.20546/ijcmas.2018.710.005.
- Spreer, E. (1998). *Milk and dairy product technology*, Marcel Decker Inc., New York, the USA, pp. 483.
- SPSS, (1999). SPSS Inc. Released 1999. SPSS for Windows, Version 10. Chicago: SPSS Inc.
- Sserunjogi, M. L., Abrahamsen, R. K., Narvhu, J. (1998). A review paper: Current knowledge of ghee and related products. *Int. Dairy J.*, 8: 677-688, doi: 10.1016/S0958-6946(98)00106-X.
- Şimşek, B. (2011). Studies on the storage stability of yayık butter. *J. Verbrauch. Lebens.*, 6: 175-181, doi: 10.1007/s00003-010-0622-y.
- Tavlaşlar-Hocalar, B., (2011). *Tereyağı Teknolojisi*, Ege Univ. Publisher, İzmir, Türkiye, s. 120.
- Turkish Food Codex. (2005). Notification No. 2005/19 on butter, milk butter based products and clarified butter, 12 April 2005 [LEX-FAOC108244].
- Woo, A. H., Lindsay, R. C. (1980). Method for the Routine Quantitative Gas Chromatographic Analysis of Major Free Fatty Acids in Butter and Cream. *J. Dairy Sci.*, 63: 1058-1064, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(80)83047-5.
- Yadav, J. S., Srinivasan, R. A. (1985). Effect of ripening cream with *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* on the flavour of ghee (clarified butterfat). *J. Dairy Res.*, 52(4): 547-553, doi: 10.1017/S002202990002450X.



**EFFECT OF UV-C TREATMENT ON MICROBIAL POPULATION AND
BIOACTIVE COMPOUNDS OF ORANGE JUICE USING MODIFIED REACTOR
BASED ON DEAN VORTEX FLOW**

Sıla Barut Gök*

Department of Food Technology, Çorlu Vocational School, Tekirdağ Namık Kemal University, Tekirdağ,
Turkey

Received / Geliş: 24.02.2021; Accepted / Kabul: 05.04.2021; Published online / Online baskı: 19.04.2021

Barut Gök, S. (2021). Effect of UV-C treatment on microbial population and bioactive compounds of orange juice using modified reactor based on dean vortex flow. *GIDA* (2021) 46(3) 634-646 doi: 10.15237/gida.GD21042

Barut Gök, S. (2021). Dean girdabı akışına dayalı reaktör tasarımı ile UV-C uygulamasının portakal suyunun mikrobiyal yükü ve biyoaktif bileşenlerine etkisi. *GIDA* (2021) 46(3) 634-646 doi: 10.15237/gida.GD21042

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effectiveness of UV-C treatment using a modified UV-C reactor based on Dean vortex flow. Parameters taken into account were total aerobic bacteria count and yeast and mould counts, antioxidant capacity, total phenolic content, 5-HMF content, furan formation and sensory attributes. A UV-C treatment with 68.75 mJ/cm² led to 2.21-log CFU/ml and 1.13-log CFU/ml reduction of TMAB and YM count, respectively. DPPH radical scavenging activity and total phenolic content of UV-C treated orange juice significantly decreased. However, UV-C induced reduction of HMF was observed. UV-C treatment would be a beneficial method to eliminate or decrease the HMF content if HMF were present in the juice as a consequences of obtained results. pH and °Brix remained constant after UV-C treatment. No furan formation was detected and no significant change observed in the quality attributes in regards to appearance and colour.

Keywords: Ultraviolet (UV) radiation; dean flow; bioactive compounds; microbial inactivation; antioxidant activity; 5-HMF; sensory evaluation

**DEAN GİRDABI AKIŞINA DAYALI REAKTÖR TASARIMI İLE UV-C
UYGULAMASININ PORTAKAL SUYUNUN MİKROBİYAL YÜKÜ VE
BİYOAKTİF BİLEŞENLERİNE ETKİSİ**

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, Dean girdabı akışına dayalı tasarlanan UV-C reaktör ile UV-C ışınlama işleminin etkinliğinin araştırılmasıdır. Çalışmada kullanılacak parametreler toplam aerobik bakteri sayısı ile maya ve küf sayısı, antioksidan kapasite, toplam fenolik madde miktarı, 5-HMF içeriği ile furan oluşumu ve duyuşal özellikler olarak belirlenmiştir. 68,75 mJ/cm² UV-C ışın uygulaması toplam mezofilik aerobik bakteri ve küf-maya sayısında sırasıyla 2,21-log CFU/ml ve 1,13-log CFU/ml azalmaya neden olmuştur. UV-C ile muamele edilmiş portakal suyunun DPPH radikal temizleme aktivitesi ve toplam fenolik içeriği önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, UV-C ışınlama ile HMF miktarında azalma saptanmıştır. Elde edilen sonuca göre, HMF içeren meyve sularında UV-C uygulaması, HMF içeriğini ortadan kaldırmak veya azaltmak için faydalı bir yöntem olacaktır. pH ve °Brix değerleri, UV-C

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ sbgok@nku.edu.tr,

☎ (+90) 282 250 3512

☎ (+90) 282 250 9939

Sıla Barut Gök; ORCID no: 0000-0001-7666-9630

işleminden sonra değişmemiştir. İşlem sonrasında, furan oluşumu tespit edilmemiş, görünüş ve renk açısından kalite özelliklerinde önemli bir değişiklik saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Ultraviyole (UV) ışın; dean akışı; biyoaktif bileşenler; mikrobiyal inaktivasyon; antioksidan aktivite; 5-HMF; duyusal değerlendirme

INTRODUCTION

Fruit juices are perceived as healthy foods by consumers to meet their nutritional requirement particularly in terms of micronutrients (Nnam and Njoku, 2005; Guerrouj et al., 2016) and are among the fresh-like food products with the increasing consumer demand in nonthermal or minimal processing for preservation (Liang et al., 2006). However, fruit juice is vulnerable to degradation by heat, microorganism, enzymes, oxygen, and light during processing and storage (Liang et al., 2006). Fresh juices are spoiled with time due to the growth of microorganisms from all three morphological groups (i.e. moulds, yeasts and bacteria) (Splittstoesser, 1982; Trifirò et al., 1997). The most frequently found bacteria in orange juice are *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and spore formers like *Bacillus*, *Alicyclobacillus* and *Clostridium* that could survive high temperatures and low pH values of fruit juices (Tran and Farid, 2004; Sadler et al., 1990; Kimball, 1991, Kimball, 1996). Therefore, juice should undergo commercial pasteurization to inactivate most of the microorganisms (Tran and Farid, 2004). However, the process tend to lose of its beneficial nutrients (Liang et al., 2006) such as vitamins (ascorbic acid) (Zerdin et al., 2003), phenolic acids and flavanones and organoleptic quality like colour, aromas (Choi and Nielsen, 2005). With the increasing consumer demand for fresh-like products such as fruit juice, there is a growing interest in non-thermal or minimal processing for food preservation. Among these methods, ultraviolet (UV) processing has gained attention in order to ensure safety and extend shelf life while minimizing negative effects on food quality attributes.

UV-C light has been used in the food industry for disinfection and decontamination treatments including water sterilization and waste water disinfection, decontamination of air in the meat and vegetable processing, surface and food packaging industry, reduction of pathogen microorganisms in red meat, poultry and fish

processing (Unluturk et al., 2008). UV-C light in the wavelength of 253.7 nm could be efficiently absorbed by the DNA (Hoyer, 1998), and inactivates most of the microorganisms (Allende et al., 2006), such as bacteria, moulds, yeasts and viruses (Price, 1965; Unluturk et al., 2008; Gabriel and Nakano, 2009; Barut Gök and Pazır, 2020).

The design of an efficient UV-C reactor made to reduce pertinent microorganisms and comply with current food safety goals is still an engineering challenge (Barut Gök et al., 2021). Compared to water, liquids have a broad range of optical and physical properties that influence UV-C light transmittance, dose delivery, and consequently microbial inactivation (Abdul Karim Shah et al., 2016). Some properties (absorbance/optical density, turbidity etc.) of the liquid being processed is one of the most important criteria to bear in mind when designing a UV-reactor.

In this study, a previously designed UV-C reactor (Barut Gök, 2018) which was purposed to eliminate some drawbacks of existing reactors like low penetration of UV-C energy and improve the energy transferred into the liquid by the flow characteristic based on the Dean vortex flow (Dean, 1927), was used to inactivate the aerobic bacteria count and yeasts and moulds count in orange juice. Furthermore, the effect of UV-C light on antioxidant activity, total phenolic content, 5-HMF and furan content and sensorial attributes were evaluated.

MATERIAL AND METHOD

Analytical determinations

The physical and physicochemical properties of orange juice was determined at $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The absorbance value of the orange juice was measured using a spectrophotometer (UV-Mini1240, Shimadzu, Japan) at 254 nm wavelength. Absorbance coefficient (A_c) was estimated from the slope of absorbance versus sample concentration plot with different dilution

factors. The amount of total soluble solids was determined using a refractometer (Hannah, USA) and was given in °Bx (Brix). The viscosity of the fruit juices was measured using a viscometer (SV-10 Series, A&D, Japan). pH values were determined using pH/mV Meter (Hannah, Hi, 2211-02, USA). The titration acidity was

determined by applying titration with 0.1 N NaOH to a pH end-point of 8.1 using pH/mV Meter (Hannah, Hi, 2211-02, USA), and the results were expressed as gram of citric acid per liter of orange (g CA/L) (AOAC, 1995). The characteristics of orange juice are given in Table 1.

Table 1 Some product characteristics of orange juice. The standard deviation is indicated (n=3).

Name	OJ
Absorption coefficient (cm ⁻¹)	28.38
pH	4.00± 0.01
Viscosity (mPa s)	2.42± 0.01
Soluble solids (°Brix)	12.00±0.9
TA*	0.82± 0.003

TA, titratable acidity, OJ, freshly squeezed orange juice
* gram citric acid/100 ml (orange juice)

Reflective flow-path UV-C reactor design and Dean Vortex

The UV-C reactor design which has a reflective flow-path consist of a low-pressure mercury lamp (TUV 75W HO UVC, Philips Co., the Netherlands) of 75 W (28.1 W UV-C output), emitting radiation peak at 254 nm. Flow occurs in

an annular gap of approx. 3 mm through a length of approx. 60.1 cm between stainless steel wall and a sleeve made from quartz glass (Fig 1). Quartz glass sleeve positioned around the UV lamp that was located in the centre of the reactor (Barut Gök, 2018; Barut Gök, 2021). A peristaltic pump adjusted the flow rate through the reactor.

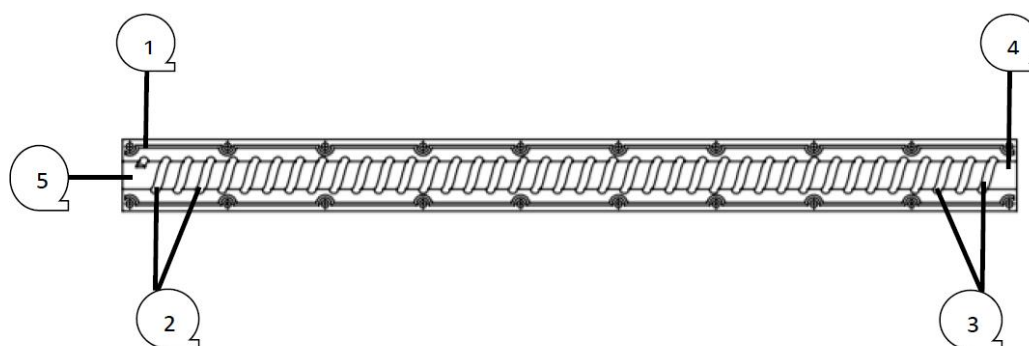


Figure 1. UV-C reactor design

The flow profile of a liquid inside a curved pipe is known as “Dean flow” and a secondary flow area is accompanied by the laminar fluid flow in the pipe due to a pressure drop caused by centrifugal forces acting in the fluid. In Dean flow based-UV reactors, the secondary flow vortices enable the irregular mixing of liquid particles (Koutchma et

al., 2007). Therefore, even in cloudy juices with low UV-penetration depths, all fluid elements could be treated (Franz et al., 2009). The fluid is therefore assumed to be ideally mixed by the effect of the dean vortices throughout the pipe. The motion of the fluid in vortexes allows the fluid to be exposed closer to the UV-C source. In

addition to this, vortices have more uniform velocity profile and narrower residence time distributions are procured (Dean, 1927).

Dean number (De) was calculated using the following equation (1) based on the geometric data of the helical flow channel and Reynolds number (Re) (Ko and Ting 2006) for “Dean flow”. In this equation, r_o (m) is the radius of the flow channel, and a (m) is the radius of the curvature of the flow channel in the spiral structure. The calculation of the dimensionless Re , which is both used in calculating the De and determining the flow regime, is given in equation (2) (Geankoplis 2003). In the equation (2), the diameter (D , m) of the flow channel corresponds to 6 mm and v (m/s) is the flow rate, ρ (kg/m³) is the density of the fluid and μ (Pa s) is the viscosity of the fluid.

$$De = Re \sqrt{(r_o/a)} \quad (1)$$

$$Re = \frac{D \times v \times \rho}{\mu} \quad (2)$$

Re for orange juice was calculated for flow rate of 2.1 ± 0.1 L/h that was determined in pre-experiments. The flow regime of both juices was laminar ($Re < 2100$). The Re numbers were calculated in light of the geometrical data of the helical coiled flow channel as 123 and 35 is the De numbers consisted during the flow in the UV-C reactor for orange juice.

UV-C dosimetry

The UV dose (D) is obtained as the multiplication of the irradiation time (t) and the UV radiation intensity (I_{avg}), as given in equation 4.

UV-C intensity was measured using an UV-radiometer (UVP, USA). The average intensity (I_{avg}) was calculated according to the Beer-Lambert law's integration, as given by equation (3) by using the incident intensity measured by the UV-C sensor (I_o) (Unluturk et al., 2008) in order to add the losses due to absorption into calculation. I_o was measured as 22.3 mW/cm^2 at the surface of quartz glass where is the shrink-fit point between quartz and the flow channel. In the equation, A_e shows the absorption coefficient

(1/cm) and L is the path length (cm) of the cuvette. The absorbance values of fruit juices were measured at 254 nm wavelength in the spectrophotometer. Different dilution factors (1:10, 1:25, 1:50, 1:100, 1:1000) were used for orange juice and A_e was estimated from the slope of the curve of the absorbance versus dilution factor. 68.75 mJ/cm^2 of UV-C doses were calculated for freshly squeezed orange juice.

$$I_{avg} (\text{mW/cm}^2) = I_o \times (1 - \exp(-A_e \times L)) / (A_e \times L) \quad (3)$$

$$D = I_{avg} \times t \quad (4)$$

Fruit Juice

Freshly squeezed orange juice was used in this study. Freshly squeezed orange juice (OJ) was analysed for microbiological analysis, antioxidant activity, total phenolic content, 5-HMF, pH, Brix, titratable acidity and sensory analysis in order to observe the effect of UV-C light on physicochemical properties and formation of 5-HMF and furan. Fresh orange juice was manufactured from oranges purchased in a local supermarket the day before juicing and stored at 4 ± 0.1 °C until juice extraction. Orange juice was obtained using a household juicer (Arzum Co., Model No. AR 164 Mela Plus, Turkey) and then filtered and then poured into the sterile bottles prior to processing.

Microbiological analysis

The microbial load was analysed by using 10 ml of orange juice and mixing it with 90 mL of sterile 0.1% peptone water. Tenfold dilution series were made in sterile 0.1% peptone water. Plate Count Agar (Merck, Germany) for total aerobic bacteria (TAB) and Potato Dextrose Agar (Merck, Germany) for yeast-mould (YM) counts were pour plated and incubated at 30 °C for 48 h (Harrigan and McCance 1976) and 25 °C for 5 days (Anonymous 2001), respectively. YM counts were enumerated together in the same medium. All microbiological analyses were performed in parallel and in triplicates. Results are given in colony forming units per milliliter (CFU/ml).

Determination of antioxidant capacity by DPPH radical scavenging method

Antioxidant activities of orange juices were determined according to (Brand-Williams et al., 1995). Different concentrations of orange juices were taken into tubes and 600 μ l of molar DPPH* radical solutions were added on it and in each tube, the total volume was completed to 6 ml with methanol. After mixing and incubating the tubes for 30 min, at room temperature and dark medium, absorbance was read at 517 nm wavelength against the control. By using the absorbance value, the % inhibition of DPPH radicals (I %) for each of the samples was calculated by using the equation (5). In equation (5), the absorption of control (methanol instead of fruit juice) was expressed as $A_{control}$ and the absorption of the sample taken into analysis was expressed as A_{sample} .

$$\text{Inhibition \%} = ((A_{control} - A_{sample}) / (A_{control})) \times 100 \quad (5)$$

Inhibition values were graphed versus different concentrations of each juice and linear regression analysis was applied in order to obtain the equation defining the curve. By using the equation, the EC_{50} value was calculated.

Determination of the total phenolic material content

The determination of phenolic compounds, as stated (Franke et al., 2004), was carried out according to the proposed method by modifying the method based on the reaction occurred between phenolic compounds of juice and Folin-Ciocalteu reagent. The absorption of the blue-coloured solution after an incubation time of 60 min was read at 720 nm wavelength and evaluated with the standard curve of Gallic acid (Singleton, 1985). The results were given as mg gallic acid equivalent/L (mg GAE/L).

Determination of 5-HMF and furan formation

The determination of 5-hydroxymethylfurfural in orange juice was carried out quantitatively, following the procedure described by the IFFJP (1985) based on the colorimetric reaction between barbituric acid, p-toluidine and HMF, forming a red-coloured complex. The intensity of red colour

is dependent upon the concentration of HMF, which was measured at 550 nm using spectrophotometer. 20 ml of juice was measured by using a measuring cylinder and transfer to a 100 ml volumetric flask. The rest of the volume was completed with deionized water and was shaken well. 2.0 ml of the diluted sample solution was pipetted to each of two tubes and 5.0 ml p-toluidine solution was added to both. All tubes were shaken well. 1.0 ml of water was added to one tube (blank value) and 1.0 ml of barbituric acid solution to the other with gentle shaking. Analysis was completed without delay and in 1-2 minutes. The absorbance of the sample against the blank was measured as soon as the colour intensity has reached a maximum (3-4 minutes after adding the barbituric acid solution), using 1 cm cells at 550 nm. The content of HMF is calculated as follows equation (6) (VdF, 1987; Başkaya Sezer et al., 2016).

$$\text{HMF, mg/L} = 162 \times (A) \quad (6)$$

Automated headspace sampling followed by Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis was used to detect furan formation. Samples were analysed for furan content on a GC/MS (GC-MS, Hewlett Packard 6890). An HP-5MS column (coated with (5%-phenyl)-methylpolysiloxane phase) (dimensions: 30m 0.25mm, film thickness: 0.25 μ m) was used for the analysis. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.7 ml/min (constant flow). The oven temperature was programmed from 50 °C (1 min), 10 °C/min ramp rate to 225 °C, and then hold for 12.5 min. The total run time for each sample was 30 min. The samples were injected with a splitting 2:1. The ionisation mode was electron ionisation (70 eV). Detection was in selected ion monitoring (SIM) mode, using three characteristic ions for furan (m/z 68 as target ion, and m/z 37 and m/z 39 as qualifiers). The injector temperature was 230 °C. Mass range was from m/z 25 to 150. For the SPME automated method, vials with 20 ml headspace were placed on a head space autosampler (HP 7694A Headspace Autosampler) and samples were equilibrated for 30 min. Analysis of furan was carried out using a modified US FDA (2004) method. The furan stock standard was prepared by transferring 50 μ L

of furan through the septum of the headspace vial containing 20.0 mL methanol (2.5 mg/ml). The working standard was prepared by transferring 250 μ L of the *ca.* 2.50 mg/ml furan stock standard to a sealed headspace vial containing 20 mL water.

The calibration curve was prepared by plotting response ratio and ratio of amounts of furan (Fig 2). The sample exposed to UV radiation was diluted suitably by transferring 5 ml juice sample into the headspace vial and adding 5 ml water.

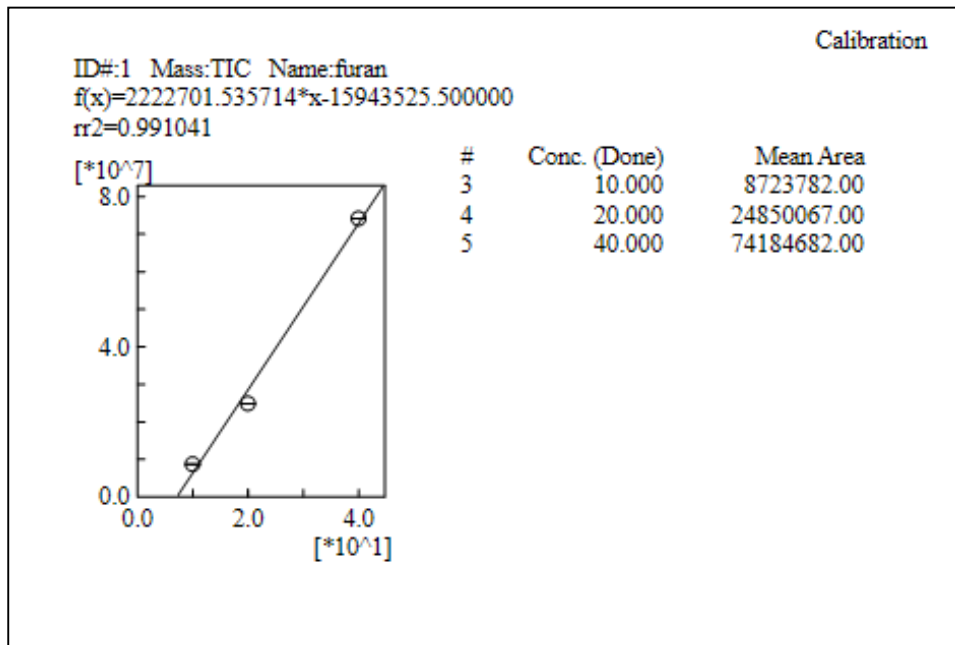


Figure 2. Furan calibration curve

Sensory analysis

Six panellists were selected and trained for the sensorial panel. Samples of 25 ml were coded with 3-digit numbers and presented to the panellists in random order in transparent cups. The overall acceptability of the juices was carried out by adopting the classic standard scoring test (Altug and Elmaci, 2005; Oras et al. 2017). The overall sensory acceptability of the treated juice was evaluated using certain parameters, such as appearance, colour, odour and taste, each on a 5-point scale ranging from 1 (dislike extremely) to 5 (like extremely) (Watts, 1989). The sensory test was replicated three times.

Statistical analysis

The generated results are averages of at least three measurements. The results were analysed for mean values and standard deviations. Also, univariate analysis of variance and the Duncan post hoc test by SPSS (Version 16.0, SPSS Inc., IL, USA) were applied to statistically analyse and

evaluate (5% levels). Evaluation of sensory analysis was done by analysis of variance according to Altuğ and Elmaci (2005).

RESULTS AND DISCUSSION

UV-C inactivation of microorganisms

The results of total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) and yeast-mould (YM) counts are summarized in Table 2. The initial number of TMAB and YM counts were determined as 3.3×10^4 and 1.2×10^5 CFU/ml for orange juice, respectively. Orange juice received UV dosage level of 68.75 mJ/cm², and resulted in a 2.21-log CFU/ml and 1.13-log CFU/ml reduction of TMAB and YM count, respectively. There were statistically significant difference in the inactivation efficiency of UV-C radiation on total mesophilic aerobic bacteria and yeast-mould count compared to untreated samples ($P > 0.05$). It was reported that a 1377 J/mL of UV-C treatment of orange juice resulted in 0.90 and 0.30-log CFU/mL reductions in total aerobes and yeast-

mould count, respectively (Keyser et al., 2008). In addition to this, a 37.5 J/mL UV-C treatment of watermelon juice resulted in 1.47 and 0.99-log CFU/ml reductions in total aerobes and yeast-mould counts, respectively while a 2.7 J/mL UV-C dose is resulted in 0.60 and 0.53-log CFU/mL reductions in total aerobes and yeast-mould (Feng et al., 2013). It was also reported that the reason for this relatively low reduction in bacterial numbers can be attributed to the cells and other particles like fibre present in the orange juice, which could act as a barrier between the UV-C rays and the bacteria (Keyser et al., 2008). In this

study, the relatively high inactivation rates could be due to the Dean effect which enables the secondary flow vortices acting in the fluid. However, previous study performed in the same reactor, the reduction in total mesophilic aerobic bacteria and yeast-mould counts of white grape juice were 5.42-log CFU/mL and 4.86-log CFU/mL at the UV-C dose of 280 mJ/cm², respectively (Barut Gök, 2018). The reason for the relatively low reduction rates in microbial load of orange juice compared to grape juice could be attributed to the cells and fibre present in orange juice (Keyser et al. 2008).

Table 2 Effect of UV-C treatment on microbial load of orange juice. The standard deviation is indicated.

Microbial Load (log CFU/ml)	Orange juice	
	UV-C dose (mJ/cm ²)	
	0	68.75
TMAB*	4.50±0.06 ^a	2.30±0.05 ^b
Yeast-mould count	5.06±0.10 ^a	3.93±0.03 ^b

^{a,b}. Different letters in each row indicate significant difference at ($p < 0.05$) (Duncan test). The freshly squeezed orange juice was evaluated among the treatment.

*TMAB, total mesophilic aerobic bacteria

Antioxidant capacity

The changes in antioxidant capacity after processing with UV-C are shown in Table 3. A significant difference was detected in the antioxidant capacities of orange juice samples between the UV-C treated and untreated. UV-C treated sample showed significant increase in the EC₅₀ value compared to control indicating a lower level of antioxidants. The percent decrease of antioxidant capacity was 32.6 % at the UV-C dose of 68.75 mJ/cm². Different reports concerning the effects of the UV dosage on the antioxidant capacity of fruit juices are available.

Similar results to our study were proved by UV-C treatment of apple juice at the doses of 20 mJ/cm² to 140 mJ/cm² (Islam et al. 2016). UV-C treatment could either enhance or decrease the antioxidants, which are entirely dependent on the exposure time, delivered dose, extraction solvents used and the basic raw material (Allothman et al., 2009). Bhat et al. (2011) reported that a non-

significant increase in the antioxidant capacity of star fruit juice after a UV-C dose of 2.158 J/m². Caminiti et al. (2011) found that non-significant decrease in antioxidant capacity of apple and cranberry juice after a dose of 5.3 J/cm². It has been reported that a non-significant change in the antioxidant capacity of UV-C treated (0.56-13.62 kJ/m²) pomegranate arils (Lopez-Rubira et al., 2005) and UV-C treated (4.0 kJ/m²) carrots (Formica-Oliveira et al., 2017). Although the knowledge about which mechanisms or parameters of UV-C treatment influence the antioxidant capacity, the actual biochemical mechanism causing an increase or decrease in the antioxidant capacity of irradiated product is still obscure.

Total phenolic content (TPC)

Orange juice showed an initial total phenolic content (TPC) of 1909±0.01 mg GAE/L (Table 3). As expected, UV-C treatment has a significant

effect on the TPC as similarly observed for antioxidant capacity. The content of total phenolic compounds in the freshly squeezed orange juice was higher than that of the UV-C treated one. Different results concerning the effect of UV-C on the TPC of different samples have been reported. It has been reported that different UV-C intensities had no significant effect on phenolic compounds of watermelon juice (Feng et al., 2013), apple juice (Caminiti et

al., 2011) and pomegranate juice (Pala and Toklucu, 2011), in comparison to untreated juice samples. Similar to the results of current study, Noci et al. (2008) reported a significant decrease in total phenolic compounds, compared to fresh juice. The reduction in the phenolic content could be due to the degradation, oxidation, or polymerization of phenolic compounds quickly during processing of juice (Feng et al., 2013).

Table 3 Effect of UV-C light on antioxidant activity, total phenols, 5-HMF content, brix, pH and TA values of orange juice. The standard deviation is indicated (n=3).

	Orange juice	
	0 (control)	UV-C dose 68.75 mJ/cm ²
EC ₅₀ ** (µl fruit juice)	3.59±0.03 ^a	4.76±0.02 ^b
Total phenols (mg GAE/L)	1909±0.01 ^a	1447±0.01 ^b
5-HMF mg/L	196±1.53 ^a	175±1.53 ^b
°Brix	12.00±0.9 ^{ns}	12±0.9 ^{ns}
pH	4.00±0.01 ^{ns}	3.97±0.01 ^{ns}
TA***	0.82±± 0.02 ^a	0.68±0.03 ^b

^{a,b} Different letters in each row indicate significant difference at (p<0.05) (Duncan test). The freshly squeezed orange juice was evaluated among the treatment.

^{ns} Not significant.

** Concentration of sample necessary to reduce by 50% the inhibition of free radical scavenging.

*** Gram citric acid/100 ml (OJ); NA, not detected

5-HMF content and furan formation

5-hydroxymethylfurfural (HMF) is formed in the Maillard reaction as well as during caramelization as the result of hexose dehydration under high-temperature environments or acidic conditions (Aguilar et al. 2016) such as fruit juices and syrups. High 5-HMF content in these products are associated with low quality (Ros-Polski et al., 2016) since high values reveal an excessive thermal treatment, inappropriate storage conditions (Aguilar et al., 2016). It would be beneficial to reduce the content or to prevent the formation of HMF which is declared as “possibly carcinogenic to humans” by The International Agency of Research on Cancer (IARC 1995). 5-HMF content is represented in Table 3. The present study showed that HMF formation did not occur immediately after the UV-C treatment.

In addition to this, the HMF content decreased after UV-C treatment. Similar results to current study it has been reported that if HMF were present in the juice, UV-C treatment would be a beneficial method to eliminate or decrease it. Moreover, HMF could be degraded by UV light regardless the initial concentration of it (Aguilar et al. 2016). UV-C induced reduction of HMF was previously observed in high fructose corn syrup and model syrups. The reduction mechanisms was explained by reversing unwanted caramelisation-induced changes to colour and flavour (Ros-Polski et al., 2016).

The primary source of furan and its derivatives in foods is believed to be from the thermal degradation of carbohydrates such as glucose, lactose, and fructose (Ros-Polski et al., 2016). In

addition to this, furan formation could occur non-thermal processing such as UV-C treatment (Fan and Geveke 2007). In this research no furan formation was detected in untreated and UV-C treated orange juice. These results are in agreement with the results of Fan (2005) where no furan was detected in apple cider exposed to a UV-C dose of 1.8 J/cm² and exposure times between 5 and 30 min of UV-C (Bule et al., 2010). Moreover, Bule et al. (2010) reported no furan formation up to 15 min of UV-C treatment in apple juice, too. Furan formation occurred after 15 min in apple juice. Furan generation in juices and beverages exposed to UV-C light is a complex process (Bule et al., 2010) and could be dependent on not only the matrix of product but also the dose applied.

pH, total soluble solids (°Brix) and titratable acidity (TA)

The effect of the UV-C treatment on pH, total soluble solids and titratable acidity are shown in Table 3. The UV-C treatment had no effect ($P < 0.05$) on parameters such as orange juice pH and total soluble solid content in both the fresh and UV-C treated juice. The fresh juice showed higher acidity than that of the UV-C treated ones. Similarly, exposure to UV light did not modify the original values of pH and °Brix of the orange and carrot juice blend (Caminiti et al., 2012), carrot juice (Riganakos et al., 2017), orange juice (Tran and Farid, 2004), white and red grape juices (Pala and Toklucu, 2013), apple juice (Caminiti et al., 2011; Falguera et al., 2011) and grapes (Pinto et al. 2016). Pala and Toklucu (2013) reported a non-significant decrease in white and red grape juices and apple juice.

Sensory attributes of juice

Additional analyses were performed to investigate the impact of UV-C light treatment on sensory properties of orange juice. The results of the sensory analysis are summarised in Table 4. Appearance and colour scores resulted not significantly affected by UV-C treatment ($P > 0.05$). Jo and Lee (2012) reported that no differences among at different doses of UV treatments in terms of sensory preference test of carrot juice. Similarly, no significant effect of UV treatment on colour of orange juice (Tran and Farid, 2004) and fresh-cut melon cubes (Manzocco et al., 2011) were detected. Sensory evaluation showed that the UV-C treated orange juice had lower odour and taste scores as compared to the untreated ones. Similarly, it has been reported that, UV-C treated carrot juice resulted to be ranked second in preference in terms of odour and taste (Riganakos et al., 2017). This result is consistent with the reports of Matak et al. (2007) and Cilliers et al. (2014) where in decrease in flavour and aroma was observed in milk. In this case, a sufficient inactivation of PPO after UV-C treatment to maintain the colour in the juice could be the reason of remained colour as reported in apple juice (Müller et al. 2014) and white grape juice (Barut Gök, 2018). The non-significant effect of UV on colour of juice could also be explained by the minor effect of UV-C on nonenzymatic browning index that indicates the browning of juice (Koutchma et al., 2016). The off-flavour observed after UV-C treatment could be explained by damaging to vitamins, antioxidants and formation of undesirable components such as oxidation products.

Table 4 Appearance, colour, odour and taste scores of orange juice. The standard deviation is indicated (n=3).

Quality attributes	Orange juice	
	0 (control)	UV-C dose 68.75 mJ/cm ²
Appearance	4.7±0.5 ^{ns}	4.5±0.8 ^{ns}
Colour	4.7±0.5 ^{ns}	4.7±0.8 ^{ns}
Odour	3.6±0.9 ^a	2.4±0.9 ^b
Taste	3.4±0.9 ^a	2.6±1.5 ^b

^{a,b} Different letters in each row indicate significant difference at ($p < 0.05$) (Duncan test). The freshly squeezed orange juice was evaluated among the treatment.

^{ns} Not significant.

CONCLUSION

UV-C light is a non-thermal processing emerging technology for pasteurization of fruit juice. However, many difficulties such as absorbance and turbidity which depends on the characteristic of the liquid influence the efficiency of the UV-C light. This obstacle could be overcome by improving the reactor design in terms of changing the flow pattern. As it has been reported in the UV-C literature, a well-designed reactor that allows sufficient penetration of UV-C to liquids in a shorter time could be used to achieve microbiologically safe juices with minimal or no damage to bioactive components (Feng et al., 2013). In this study, by improving the flow channel of UV-C reactor it was aimed to not only improve the microbial efficiency of UV-C light but also minimize the degradation of bioactive compounds and formation of undesirable sensory consequences. It could be concluded that the designed reactor were effective in inactivating the microbial load in relatively low doses of UV-C compared to the results of juices in the literature which has been exposed higher doses. The results obtained in this study clearly indicated that the designed reactor has good potential to improve the microbiological quality of orange juice. However, further studies will be conducted to assess the efficiency of the reflective flow-path UV-C reactor design for the treatment of highly absorbing and scattering fluids or media. Although previous studies realised by the reactor occurred increase in bioactive compounds of apple, white and red grape juices it has been observed general reduction in antioxidant capacity and total phenolic in orange juice. This results showed that the designed reactor could be used in combination with other non-thermal preservation methods in order to prevent or decrease the loss of bioactive compounds from the point of view of orange juice. In addition to this, as has been previously suggested in the literature actual biochemical mechanism causing a degradation in the antioxidant capacity of irradiated product needs to be further studied. UV-C treatment in this research maintained the sensory attributes in terms of appearance and colour compared to fresh ones. As has been reported previous reviews very limited published

researches are available in regards to effects of UV-C treatment on sensory attributes of juices. The study demonstrated that the UV-C light is a promising preservation method with keeping in mind that necessity of designing further studies in order to ascertain the exact parameters for each product.

CONFLICT OF INTEREST

The author expresses no conflict of interest associated with this work.

REFERENCES

- Abdul Karim Shah, N.N.; Shamsudin, R.; Abdul Rahman, R.; Adzahan, N.M. (2016). Fruit juice production using ultraviolet pasteurization: a review. *Beverages* 2(3): 1-20.
- Aguilar, K., Garvin, A., Ibarz, A. (2016). Effect of the concentration on the kinetic model of the photo-degradation of 5-hydroxymethylfurfural by UV irradiation. *J Food Eng*, 191: 67-76.
- Allende, A., Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I. (2006). Minimal processing of healthy traditional foods. *Trends Food Sci Technol*, 17:513–519.
- Alothman, M., Bhat, R., Karim, A.A. (2009). Effects of radiation processing on phytochemicals and antioxidants in plant produce. *Trends Food Sci Technol*, 20(5): 201-212.
- Altug, T. Elmaci, Y. (2005). *Gıdalarıda Dnyusal Değerlendirme*. Izmir: Meta Press, Turkey.
- Anonymous (2001). Bacteriological analytical manual chapter 18 yeasts, molds and mycotoxins.
- AOAC, 1995. Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis (16th ed.), Washington, USA.
- Barut Gök, S. (2021). UV-C treatment of apple and grape juices by modified UV-C reactor based on Dean vortex technology: Microbial, physicochemical and sensorial parameters evaluation. *Food Bioprocess Technol*, <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02624-z>.
- Barut Gök, S., Gräf, V., Stahl, M.R. (2021). *Engineering Aspects of UV-C Processing for Liquid Foods*, Editor(s): Kai Knoerzer, Kasiviswanathan Muthukumarappan, Innovative Food Processing

- Technologies, Elsevier, 2021, Pages 171-181, ISBN 9780128157824, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23000-X>.
- Barut Gök, S., Pazır, F. (2020). Effect of treatments with UV-C light and electrolysed oxidizing water on decontamination and the quality of Gemlik black olives. *J Consum Prot Food Saf*, 15: 171–179. <https://doi.org/10.1007/s00003-019-01263-z>.
- Barut Gök, S. (2018). Usage of gamma irradiation (γ) and ultraviolet (UV) radiation in inactivation of the microorganisms of grape juice and the effects of operations on the quality of product. PhD Thesis. Tekirdağ Namık Kemal University Natural and Applied Science, Department of Food Engineering, Turkey, 255 p.
- Başkaya Sezer, D., Erdoğan Tokatlı, K. Demirdöven, A. (2016). Bullace and Yonuz Plum Marmalades. *JAFAG*, 33 (1): 125-131.
- Bhat, R., Ameran, S. B., Voon, H. C., Karim, A. A., Tze, L. M. (2011). Quality attributes of starfruit (*Averrhoa carambola* L.) juice treated with ultraviolet radiation. *Food Chem*, 127(2): 641-644. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.042.
- Bule, MV., Desai, KM., Parisi, B., Parulekar, SJ, Slade, P., Singhal, RS, Rodriguez, A. (2010). Furan formation during UV-treatment of fruit juices, *Food Chem*, 122: 937-942.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-FOOD SCI TECHNOL*, 28(1): 25-30.
- Caminiti I.M., Noci, F., Morgan, D. J., Cronin, D. A., Lyng, J., G., (2012). The effect of pulsed electric fields, ultraviolet light or high intensity light pulses in combination with manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. *Food Bioprod Process*, 90: 442–448.
- Caminiti, I. M., Noci, F., Munoz, A., Whyte, P., Morgan, D. J., Cronin, D. A., et al. (2011). Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chem*, 124(4): 1387-1392.
- Cilliers, F. P., Gouws, P. A., Koutchma, T., Engelbrecht, Y., Adriaanse, C., Swart, P. (2014). A microbiological, biochemical and sensory characterisation of bovine milk treated by heat and ultraviolet (UV) light for manufacturing Cheddar cheese. *IFSET*, 23: 94-106.
- Choi, L.H., Nielsen, S.S. (2005). The effect of thermal and non-thermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. *J. Food Qual*, 28: 13–29.
- Dean, W.R. (1927). Motion of fluid in a curved pipe. *Philos Mag*, p. 15.
- Falguera, V., Pagan, J., Ibarz, A., (2011). Effect of UV irradiation on enzymatic activities and physicochemical properties of apple juices from different varieties. *LWT-FOOD SCI TECHNOL*, 44: 115-119.
- Fan, X., (2005). Antioxidant capacity of fresh-cut vegetables exposed to ionizing radiation. *J Sci Food Agric*, 85(6): 995-1000.
- Fan, X., Geveke, D. J., (2007). Furan formation in sugar solution and apple cider upon ultraviolet treatment. *J Agric Food Chem*, 55(19): 7816-7821.
- Feng M., Ghafoor, K., Seo, B., Yang, K., Park, J., (2013). Effects of ultraviolet-C treatment in Teflon®-coil on microbial populations and physico-chemical characteristics of watermelon juice. *IFSET*, 19: 133–139.
- Franke, S. I. R., Ckless, K., Silveira, J. D., Rubensam, G., Brendel, M., Erdtmann, B., et al. (2004). Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chem*, 88(1), 45-55. doi:10.1016/j.foodchem.2004.01.021.
- Franz, C.M.A.P., Specht, I., Gyu-Sung, C., Graef, V., Stahl, M.R., (2009). UV-C inactivation of microorganisms in naturally cloudy apple juice using novel inactivation equipment based on Dean vortex technology. *Food Control*, 20: 1103–1107.

- Food and Drug Administration (2004). Exploratory data on furan in food data. US Food and Drug Administration.
- Formica-Oliveira, A.C., Martinez-Hernandez, G. B., Diaz-Lopez, V., Artes, F., Artes-Hernandez, F., (2017). Effects of UV-B and UV-C combination on phenolic compounds biosynthesis in fresh-cut carrots. *POSTHARVEST BIOL TEC*, 127: 99–104.
- Gabriel, A.A., Nakano, H., (2009). Inactivation of Salmonella, E. coli and Listeria monocytogenes in phosphate-buffered saline and apple juice by ultraviolet and heat treatments. *Food Control* 20: 443–446
- Geankoplis, C.J. (2003). *Transport processes and Unit Operations* *Transport processes and Unit Operations*. New Jersey: Prentice Hall.
- Guerrouj, K. Sanchez-Rubio, M., Taboada-Rodriguez, A., Cava-Rolla, R.M., Marin-Iniesta, F., (2016). Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice *FOOD BIOPROD PROCESS*, 99: 20-28, 10.1016/j.fbp.2016.03.007
- Harrigan, W.F., McCance, M.E., (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press, London.
- Hoyer, O., (1998). Testing performance and monitoring of UV systems for drinking water disinfection. *Water Supply*, 16(1/2): 419-442.
- IARC, International Agency for Research on Cancer (1995). Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 63: 393–407.
- IFFJP (1985). International federation of fruit juice producers (IFFJP) methods. Analysen-analysis. Zug. Switzerland: Fruit-Union Suisse Assoc. Svizzera Frutta.
- Islam, M.S., Patras, A., Pokharel, B., Wu, Y., Vergne, M.J., Shade, L., Xiao, H., Sages, M., (2016). UV-C irradiation as an alternative disinfection technique: Study of its effect on polyphenols and antioxidant activity of apple juice. *IFSET*, 34: 344–351.
- Jo, C., Lee, K.H., (2012). Comparison of the efficacy of gamma and UV irradiation in sanitization of fresh carrot juice. *Radiat Phys. Chem*, 81: 1079–1081.
- Keyser, M., Müller, I.A., Cilliers, F.P., Nel, W., Gouws, P.A., (2008). Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice, *IFSET*, 9: 348–354.
- Kimball, D. A., (1991). *Citrus processing quality control and technology* (pp. 117-126, 227-235). New York: Van Nostrand Reinhold.
- Kimball, D. (1996). *Oranges and tangerines*. In L. P. Somogyi, D. M. Barrett, Y. H. Hui (Eds.), *Processing Fruits: Science and Technology*, major processed products, vol. 2 (pp. 265 – 304). USA, Western Hemisphere Technomic Publishing Company.
- Ko, T. H., Ting, K. (2006). Optimal Reynolds number for the fully developed laminar forced convection in a helical coiled tube. *Energy*, 31(12), 2142-2152. doi:10.1016/j.energy.2005.09.001.
- Koutchma, T., Popovic, V., Ros-Polski, V., Popielarz, A., (2016). Effects of Ultraviolet Light and High-Pressure Processing on Quality and Health-Related Constituents of Fresh Juice Products. *COMPR REV FOOD SCI F*, 15:844-867.
- Koutchma, T., Paris, B., Patazca, E., (2007). Validation of UV coiled tube reactor for fresh juices. *J ENVIRON ENG SCI*, 6(3):319-328. doi:10.1139/S06-058.
- Liang, Z.W., Cheng, Z., Mittal, G.S., (2006). Inactivation of spoilage microorganisms in apple cider using a continuous flow pulsed electric field system. *LWT-FOOD SCI TECHNOL*, 39(4):351-357. doi:10.1016/j.lwt.2005.02.019.
- Lopez-Rubira, V., Conesa, A., Allende, A., Artes, F., (2005). Shelf life and overall quality of minimally processed pomegranate arils modified atmosphere packaged and treated with UV-C. *POSTHARVEST BIOL TEC*, 37:174–185.
- Manzocco, L., Da Pieve, S., Maifreni, M., (2011). Impact of UV-C light on safety and quality of fresh-cut melon. *IFSET*, 12:13–17.

- Matak, K.E., Sumner, S.S., Duncan, S.E., Hoving, E., Worobo, R. W., Hackney, C.R., Pierson, M.D., (2007). Effects of ultraviolet irradiation on chemical and sensory properties of goat milk. *J Dairy Sci*, 90(7): 3178-3186.
- Müller, A., Noack, L., Greiner, R., Stahl, M. R., Posten, C., (2014). Effect of UV-C and UV-B treatment on polyphenol oxidase activity and shelf life of apple and grape juices. *IFSET*, 26:498–504.
- Nnam, N.M., Njoku, I.E., (2005). Production and evaluation of nutrient and sensory properties of juices made from citrus fruits. *Nig J Nutr Sci*, 26(2): 62–66.
- Noci, F., Riener, J., Walking-Ribeiro, M., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Lyng, J.G., (2008). Ultraviolet irradiation and pulsed electric fields (PEF) in a hurdle strategy for the preservation of fresh apple juice. *J Food Eng*, 85:141–146.
- Oras, A., Akagic, A., Gasi, F., Spaho, N., Kurtovic, M., Meland, M., (2017). *Sensory evaluation of blended cloudy apple juices*. Works of the Faculty of Agriculture and Food Sciences, University of Sarajevo, 67: 493-504.
- Pala, C.U., Toklucu, A.K., (2013). Effects of UV-C Light Processing on Some Quality Characteristics of Grape Juices. *Food Bioprocess Technol*, 6: 719-725.
- Pala, C.U., Toklucu, A.K., (2011). Effect of UV-C light on anthocyanin content and other quality parameters of pomegranate juice. *J Food Compos Anal*, 24, 790–795.
- Pinto, E.P., Perin, E. C., Schott, I. B., Rodrigues, R.S., Lucchetta, L., Manfroi, V., Rombaldi, C. V., (2016). The effect of postharvest application of UV-C radiation on the phenolic compounds of conventional and organic grapes (*Vitis labrusca* cv. Concord). *POSTHARVEST BIOL TEC*, 120: 84–91.
- Price, W.C., (1965). Inactivation of southern bean mosaic virus by ultraviolet light. *Virol J*, 25:1–8.
- Riganakos, K. A., Karabagias, I. K., Gertzou, I., Stahl, M., (2017). Comparison of UV-C and thermal treatments for the preservation of carrot juice. *IFSET*, 42: 165–172.
- Ros-Polski, V., Popovic, V., Koutchma, T., (2016). Effect of ultraviolet-C light treatment on Hydroxymethylfurfural (5-HMF) content in high fructose corn syrup (HFCS) and model syrups. *J Food Eng*, 179: 78-87.
- Sadler G., Parish M., Davis J. (1990). Diacetyl Measurement in Orange Juice Using Differential Pulse Polarography, *J Food Sci*, (55)4: 1164 – 1165.
- Singleton, V.L., (1985). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *The Curr Cont Agr Biol Envir Sci*, 48: 18-18.
- Splittstoesser, DF., (1982). Microorganisms Involved in the Spoilage of Fermented Fruit Juices. *J Food Prot*, 45(9):874-877. doi: 10.4315/0362-028X-45.9.874.
- Tran, M.T.T., Farid, M., (2004). Ultraviolet treatment of orange juice, *IFSET*, 5: 495– 502.
- Trifirò, A, Saccani, G, Gherardi, S, Vicini, E, Spotti, E, Previdi, MP, Ndagijimana, M, Cavalli S, Reschiotto C., (1997). Use of ion chromatography for monitoring microbial spoilage in the fruit juice industry. *J Chromatogr A*, 770:243–252.
- Unluturk, S., Atilgan, M. R., Baysal, A. H., Tari, C., (2008). Use of UV-C radiation as a non-thermal process for liquid egg products (LEP). *J Food Eng*, 85(4): 561-568. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.08.017.
- Watts, B., (1989). *Basic sensory methods for food evaluation*, International Development Research Centre, Canada.
- VdF (1987). RSK-Values. *The Complete Manual*. Verband der deutschen Fruchtsaffindustrie e.v. Bonn, Germany.
- Zerdin, K., Rooney, M.L., Vermue, J., (2003). The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chem*, 82: 387–395.

FARKLI MİKRODALGA GÜÇ SEVİYELERİNDE VE FARKLI FIRIN SICAKLIKLARINDA KURUTULAN HİBİSKUS ÇANAK YAPRAKLARININ KURUMA KARAKTERİSTİKLERİNİN VE BAZI FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Cüneyt Dinçer^{1,2*}, Ahu Çınar³, Safinaz Elmasulu⁴

¹ Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, Türkiye

² Akdeniz Üniversitesi, Finike Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü, Antalya, Türkiye

³ Batı Akdeniz Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Gıda Teknolojisi ve Tıbbi, Aromatik Bitkiler Bölümü, Antalya, Türkiye

⁴ Akdeniz Üniversitesi, Korkuteli Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş / Received: 09.02.2021; Kabul / Accepted: 05.04.2021; Online baskı / Published online: 19.04.2021

Dinçer, C., Çınar, A., Elmasulu, S. (2021). Farklı mikrodalga güç seviyelerinde ve farklı fırın sıcaklıklarında kurutulan hibiskus çanak yapraklarının kuruma karakteristiklerinin ve bazı fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA* (2021) 46 (3) 647-659 doi: 10.15237/gida.GD21030

Dinçer, C., Çınar, A., Elmasulu, S. (2021). Determination of drying characteristics and some physicochemical characteristics of hibiscus calyx dried at different microwave power levels and different oven temperatures. GIDA (2021) 46 (3) 647-659 doi: 10.15237/gida.GD21030

ÖZ

Bu çalışmada farklı sıcaklıklarda (60, 70, 80 °C) fırında ve farklı mikrodalga güç seviyelerinde (180, 300, 450 Watt) mikrodalga fırında kurutmanın Antalya koşullarında yetiştirilen ve hasat edilen hibiskus çanak yapraklarının kuruma karakteristikleri ve bazı fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Örneklerin kurutma karakteristiğinin değerlendirilmesinde on üç farklı model kullanılmıştır. Hibiskus çanak yapraklarının kurutma verilerine en iyi uyumu sağlayan model Midilli vd. ($R^2 \geq 0.9983$; $\chi^2 \leq 0.5156$; RMSE ≤ 0.0193) olmuştur. Mikrodalga fırında gerçekleştirilen kurutma işleminin fırında gerçekleştirilen kurutma işlemine göre kurutma süresini yaklaşık 10 kat kısalttığı belirlenmiştir. Ayrıca kurutulan örneklerin pH, iletkenlik, renk, bulanıklık, antosiyanin ve fenolik madde içeriği gibi kalite özelliklerinde de önemli farklılıklar gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Hibiskus, mikrodalga kurutma, matematiksel modelleme, kalite özellikleri

DETERMINATION OF DRYING CHARACTERISTICS AND SOME PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF HIBISCUS CALYX DRIED AT DIFFERENT MICROWAVE POWER LEVELS AND DIFFERENT OVEN TEMPERATURES

ABSTRACT

In this study, the effect of drying in the oven at different temperatures (60, 70, 80 °C) and in the microwave oven at different microwave power levels (180, 300, 450 Watt) on the drying

* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author;

✉ cdincer@akdeniz.edu.tr

☎ (+90) 242 227 2057

☎ (+90) 242 227 2057

Cüneyt Dinçer; ORCID no: 0000-0002-9160-4242

Ahu Çınar; ORCID no: 0000-0001-7095-1192

Safinaz Elmasulu; ORCID no: 0000-0003-2794-037X

characteristics and some physicochemical properties of hibiscus calyx grown and harvested in Antalya conditions was investigated. Thirteen different mathematical models were used to describe the drying kinetics. The Midilli and others model exhibited best fit to drying data of hibiscus calyx ($R^2 \geq 0.9983$; $\chi^2 \leq 0.5156$; $RMSE \leq 0.0193$). It was determined that the drying process carried out in the microwave oven shortened the drying time approximately 10 times compared to the drying process carried out in the oven. Besides, no significant differences were observed in the quality characteristics of the dried samples such as pH, conductivity, color, turbidity, anthocyanin, and phenolic contents.

Keywords: Hibiscus, microwave drying, mathematical modeling, quality properties.

GİRİŞ

Hibiscus sabdariffa L. tropikal ve subtropikal iklimlerde yetiştirilebilen, Malvaceae familyasından, çalimsı bir bitkidir (Gedik, 2014). Ülkemizde bamyaya çiçeği, kara bamyaya, Sudan bamyası, kerkeke veya hibiskus gibi isimlerle anılmaktadır (Özdoğan, 2001; Gedik, 2014; Dinçer vd., 2020). Bitkinin ticari olarak önemli olan kısmı meyvelerin etrafını saran etli çanak yapraklarıdır (kaliksleri) (Özdoğan, 2001; Gedik, 2014; Dinçer vd., 2020).

Hibiskus çanak yaprakları karbonhidrat, protein, ham lif ve askorbik asit içermektedir. Sitrik asit, hidrokisisitrik asit, hibiskus asidi, malik asit ve tartarik asit gibi organik asitleri de farklı oranlarda içermesinin yanında ticari olarak önemi özellikle antosiyanin içeriğinden kaynaklanmaktadır. Delfinidin-3-sambiosit ve siyanidin-3-sambiosit hibiskus çanak yapraklarında bildirilen başlıca antosiyaninlerdir (Da-Costa-Rocha vd., 2014; Cid-Ortega ve Guerrero-Beltrán, 2015).

Halk arasında farklı hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır kullanılan hibiskus ekstraktlarının, son dönemde yapılan çalışmalarda içerdiği biyoaktif maddelere bağlı olarak antioksidan, antibakteriyel, diüretik, ateş düşürücü, tansiyon düşürücü, antikolesterol ve antidiyabetik özellikler gösterdiğinin vurgulanması bu bitkilerin tüketimini ve değerini arttırmıştır (Da-Costa-Rocha vd., 2014; Cid-Ortega ve Guerrero-Beltrán, 2015). Hibiskus çanak yaprakları gıda endüstrisinde bitki çayı, sıcak ve soğuk içecekler, reçel, şekerlemeler, dondurma, çikolata, tatlandırıcılar, puding ve pasta gibi ürünlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Da-Costa-Rocha vd., 2014; Cid-Ortega ve Guerrero-Beltrán, 2015). Hibiskus çanak yaprakları sayılan bu ürünlerin bazılarında, özellikle yetiştirildiği bölgelerde taze olarak kullanabildiği gibi daha çok

kurutulduktan sonra kullanılmaktadır (Wong vd., 2003; Chumsri vd., 2008).

Hibiskus çanak yapraklarının biyoaktif bileşenleri ve potansiyel kullanım alanları göz önüne alındığında yıl boyunca kurutulmuş ürün olarak kullanımını daha cazip olarak görmektedir. Ayrıca kurutma işlemi ürünün nakliye ve depolama sürecinde de fayda sağlamaktadır (Zielinska ve Michalska, 2016). Hibiskus çanak yaprakları, geleneksel olarak doğrudan güneş altında kurutulmaktadır (Daniel vd., 2012). Ancak bu kurutma yönteminde koşulların kontrollü olmamasının yanında özellikle antioksidan özelliğe sahip bileşenlerde kayıplar meydana gelebilmektedir. Diğer taraftan gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan geleneksel termal yöntemlerde de özellikle sürenin uzamasına bağlı olarak ısıya hassas bileşenlerde önemli kayıplar, renk ve aromada istenmeyen değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu kayıpların azaltılmasına yönelik olarak, termal yöntemle kombine olarak kullanılan sistemlerin yanı sıra alternatif kurutma yöntemleri üzerine de çalışmalar yürütülmektedir. Bu kapsamda termal yöntemle kıyasla daha kısa sürede, enerji ve kütle transferine imkân tanıyan mikrodalga kurutma gibi yöntemler ön plana çıkmaktadır (Kumar vd., 2016).

Mikrodalga ile ısıtma tekniğinde gıda maddesinde hacimsel ısıtma meydana gelmektedir. Hacimsel ısıtma, gıdaların mikrodalga enerjisini doğrudan ve dahili olarak emme ve ısıya dönüştürme yeteneği olarak ifade edilmektedir. Geleneksel ısıtmada ısı genellikle yüzeyden iç kısma doğru aktarılırken, mikrodalga ısıtmada ürün boyunca ısı üretilir. Bu nedenle, bir mikrodalga işleminde ısıtma oranları genellikle geleneksel ısıtmadan daha yüksektir (Chandrasekaran vd., 2013). Diğer taraftan mikrodalga ısıtmanın sürekli modda

uygulanması aşırı ve düzensiz ısınmaya dolayısıyla ürünün kalite özelliklerinde istenmeyen bazı değişikliklere neden olabilmektedir. Araştırmalar, aralıklı mikrodalga işleminin hem enerji verimliliğini hem de ürün kalitesini artırdığını göstermektedir (Kumar vd., 2016). Bu nedenle mikrodalga uygulamaları genelde kesikli uygulama modunda tercih edilmektedir.

Değinilen açıklamalar doğrultusunda bu çalışmada Antalya şartlarında yetiştirilen *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisinin farklı mikrodalga güç seviyelerinde ve farklı sıcaklıklarda fırında kurutulması ve kurutma şartlarının kuruma karakteristikleri ve bazı fizikokimyasal özellikler üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada materyal olarak Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) uygulama sahasında yetiştirilen *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisinin çanak yaprakları kullanılmıştır. Hibiskus çanak yaprakları çiçeklenmenin devam ettiği Kasım ayında hasat edilmiş ve aynı gün kurutma çalışmalarının gerçekleştirileceği laboratuvara getirilmiştir. Yıkanan hibiskus numuneleri süzöldükten sonra kaba filtre kağıtları üzerinde, ezik ve çürük olanlarından arındırılmıştır. Daha sonra hibiskus çanak yaprakları iç kısımlarında yer alan tohum kapsülünden ayrılmıştır. Ardından dijital kumpas ile ölçümleri gerçekleştirilen ve ortalama aynı kalınlığa sahip (~1.5 mm) çanak yapraklar (başlangıç nem içeriği %89.93) kurutma uygulamalarında kullanılmıştır.

Yöntem

Fırında kurutma

Hibiskus örneklerinin fırında kurutma işlemi 60 (T 60), 70 (T 70) ve 80 (T 70) °C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta Memmert IN 110 (Almanya) marka fırında gerçekleştirilmiştir. Fırın sıcaklığı istenen değere ulaştıktan sonra örnekler cam petri kaplarında tartılmış ve örnekler sabit tartıma (~%15 nem içeriğine) ulaşana kadar kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Matematiksel modelleme için örneklerin ağırlığı, 60°C'de kurutulan örneklerde saatte bir, 70 ve 80 °C'de kurutulan örneklerde ise 30 dk aralıklar ile hassas

terazi (Sartorius ED224S, Almanya) kullanılarak ölçülmüştür.

Mikrodalga fırında kurutma

Hibiskus örneklerinin mikrodalga fırında kurutma işlemi 180 (MW 180), 300 (MW 300) ve 450 Watt (MW 450) olmak üzere üç farklı güç seviyesinde otomatik olarak kesikli (180 W: 8 sn açık 22 sn kapalı, 300 W: 12 sn açık 18 sn kapalı, 450 W:18 sn açık 12 sn kapalı) çalışan programlanabilir mikrodalga fırında (SAMSUNG ME86V 00-800W 2450 MHz, Güney Kore) gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga güç seviyelerinin (180, 300 ve 450 W) seçiminde örneklerde ani ısınma, bölgesel yanma vb. olumsuzlukların yaşanmaması ve benzer çalışma sonuçları dikkate alınmıştır. Örnekler cam petri kaplarında tartılmış ve mikrodalga fırının içine yerleştirilmiştir. Örnekler sabit tartıma (~%15 nem içeriğine) ulaşana kadar kurutma işlemine devam edilmiştir. Matematiksel modelleme için 180 W gücünde kurutulan örnekler 5 dk, 300 W gücünde kurutulan örnekler 3 dk, 450 W gücünde kurutulan örnekler ise 2 dk aralıklar ile hassas terazi (Sartorius ED224S, Almanya) kullanılarak tartılmıştır.

Kurutma işleminin modellenmesi

Örneklerin kurutma karakteristiklerinin tanımlanmasında Çizelge 1'de verilen modeller kullanılmıştır.

Kurutma deneyleri sırasında hibiskus örneklerinin nem oranı (MR) Eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır. Eşitlikteki denge nem içeriği (M_e) değeri, başlangıçtaki nem içeriği (M_0) ve herhangi bir zamandaki nem içeriği (M_t) değerinden çok küçük olduğu için 0 olarak kabul edilmiştir (Aykın-Dinçer vd., 2020). Tüm nem içerikleri kg su /kg kuru madde olarak ifade edilmiştir.

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e} \quad (1)$$

Doğrusal olmayan en küçük kareler regresyonu analizi SigmaPlot 14.0 (Systat Software Inc. ABD) istatistik programı kullanılarak kurutma verileri analiz edilmiş ve modellerin regresyon katsayıları (R^2) ve model sabitleri belirlenmiştir. Modellerin ki-kare (reduced chi-square, χ^2) ve hata kareler ortalamasının karekökü (Root mean square error,

RMSE) değerleri ise aşağıdaki eşitliklerle hesaplanmıştır (Aykın-Dinçer vd., 2020). En küçük χ^2 ve RMSE değeri ve en yüksek R^2 değerine sahip olan model, örneklerin kuruma davranışını en iyi temsil eden model olarak tespit edilmiştir

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (MR_{pre,i} - MR_{exp,i})^2}{n-z} \quad (2)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (MR_{pre,i} - MR_{exp,i})^2} \quad (3)$$

Eşitlik 2 ve 3'te yer alan $MR_{exp,i}$ i'inci gözlemde deneysel olarak ölçülen nem oranı, $MR_{pre,i}$ modelde i'inci gözlemde tahmin edilen nem oranı, n gözlemlerin sayısı ve z ise modeldeki sabitlerin sayısıdır.

Çizelge 1. Hibiskus örneklerinin kurutma verilerini açıklamak için seçilmiş kurutma modelleri

Table 1. Selected drying models for describing hibiscus samples drying data

Model adı Model name	Model eşitliği Model equation	Kaynak Reference
Lewis	$MR = \exp(-k.t)$	Özdemir ve Devres 1999
Henderson ve Pabis Henderson and Pabis	$MR = a.\exp(-k.t)$	Delgado vd., 2014
Page	$MR = \exp(-kt^n)$	Yaldiz ve Ertekin 2001
İki-terimli Two-term	$MR = a.\exp(-k_0.t) + b.\exp(-k_1.t)$	Delgado vd., 2014
İki-terimli üssel Two-term exponential	$MR = a.\exp(-k.t) + (1-a).\exp(-k.a.t)$	Yaldiz ve Ertekin 2001
Logaritmik Logarithmic	$MR = a.\exp(-k.t) + c$	Yaldiz ve Ertekin 2001
Wang ve Singh Wang and Singh	$MR = 1 + a.t + b.t^2$	Özdemir ve Devres 1999
Modifiye Henderson ve Pabis Modified Henderson and Pabis	$MR = a.\exp(-kt) + b.\exp(-g.t) + c.\exp(-ht)$	Delgado vd., 2014
Midilli vd. Midilli and others	$MR = a.\exp(-kt^n) + b.t$	Midilli vd., 2002.
Verma	$MR = a.\exp(-kt) + (1-a).\exp(-g.t)$	Yaldiz ve Ertekin 2001
Diffüzyon yaklaşımı Diffusion approach	$MR = a.\exp(-kt) + (1-a).\exp(-k.b.t)$	Swain vd., 2012.
MR'in kökü Root of B-B ₀	$MR = (n + k.t)^2$	Vega-Gálvez vd., 2008.
Modifiye Page Modified Page	$MR = \exp(-(kt)^n)$	Delgado vd., 2014

t: kurutma süresi (dk); MR: nem oranı, k, a, b, c, g, n, k₀, k₁ model sabitleri.

t: drying time (min); MR: moisture ratio, k, a, b, c, g, n, k₀, k₁ are model constants.

Analiz yöntemleri

Ekstraksiyon

Kurutulmuş örneklerin daha çok sulu ekstraktlarının kullanımı göz önüne alınarak Dinçer vd (2020)'ne göre sulu ekstraktları hazırlanmış ve ekstraktlarda analizler gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların hazırlanması için kurutulmuş örnekler blendırda (Waring, ABD) öğütüldükten sonra elekler (Retsch, Almanya) ile

elenerek partikül büyüklüğünün 0.5-1 mm aralığında olması sağlanmıştır. Ardından 2 g örnek 100 mL'lik cam şişelere aktarılmış ardından, katı sıvı oranı 1/40 olacak şekilde üzerine ekstraksiyon sıcaklığındaki distile su ilave edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 30 dk boyunca ultrasonik banyoda (Çalışkan Ultrasonic cleaner, Türkiye) 40 °C sıcaklıkta, 40 kHz sabit frekansta ve 0.031 W/mL akustik güç yoğunluğunda (AGY)

uygulanmıştır. AGY, Tiwari vd., (2008)'nin rapor ettiği metoda göre kalorimetrik olarak belirlenmiştir. İşlem sonunda kaba filtreden süzülen örnekler analizlere kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Suda çözünür kuru madde tayini (SÇKM)

Örneklerin suda çözünebilir kuru madde miktarı refraktometre (PAL- α ATAGO, Tokyo, Japonya) ile oda sıcaklığında ölçülmüştür.

pH ve iletkenlik ölçümü

Örneklerin pH ve iletkenlik değerleri oda sıcaklığında dijital pH metre (Orion 4-Star pH meter, Thermo Scientific, ABD) ve iletkenlik ölçer (Mettler Toledo S230, İsviçre) kullanılarak ölçülmüştür.

Renk analizi

Örneklerin renk analizi Konica-Minolta CR-400 (Japonya) renk ölçer cihazı ve sıvı kabı kullanılarak yapılmıştır. Renk, L* (koyuluk-açıklık), a* (yeşillik-kırmızılık), b* (mavilik-sarılık) renk parametreleri cinsinden ifade edilmiştir. Ayrıca Hue açısı (h) ve Chroma (C) değerleri aşağıdaki eşitlikler ile hesaplanmıştır.

$$h^{\circ} = \frac{180}{\pi} \tan^{-1}(b/a) \quad (4)$$

$$C = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad (5)$$

Bulanıklık

Örneklerdeki bulanıklık değeri ölçümü için örnek 95 mm yüksekliği ve 25 mm çapa sahip örnek kabına yerleştirilmiş ve türbidimetre (Hach 2100 N Turbidimeter, A.B.D.) kullanılarak NTU (Nephelometric Turbidity Unit) değeri cinsinden belirlenmiştir (Tajchakavit vd., 2001).

Toplam fenolik madde

Toplam fenolik madde miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla, 0.5 mL örnek üzerine sırasıyla 2.5 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi (Merck, Almanya) (saf su ile 10 kat seyreltilmiş) ve (0.5 ile 2 dk arasında bekleme süresinden sonra) 2 mL %7.5'lik Na₂CO₃ (Merck, Almanya) çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen karışım vorteksle karıştırıldıktan sonra 50°C'deki su banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığına

soğutulmuş spektrofotometrede (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis, ABD) 760 nm dalga boyunda, okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit çözeltileri (20, 40, 60, 80 100 mg/L) ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi ($y=0.0108x + 0.008$, $R^2 = 0.9997$) yardımıyla mg gallik asit eşdeğeri/L (mg GAE/L) ekstrakt ve g gallik asit eşdeğeri /kg (g GAE/kg) örnek olarak sunulmuştur (Şkerget vd., 2005).

Toplam monomerik antosiyanin analizi

Örneklerde toplam monomerik antosiyanin tayini pH diferansiyel metodu ile spektrofotometrik (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis, ABD) olarak belirlenmiş ve sonuçlar siyanidin-3-glukozit cinsinden mg/L ve g/kg olarak sunulmuştur (Wang ve Xu, 2007).

İstatiksel analizler

Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş, analizler iki paralelli olarak yürütülmüştür. Ortalamalar varyans analizine tabi tutularak, önemli bulunan farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (SAS System for Windows V7, SAS Institute, Cary, NC, ABD) ile ortaya konulmuştur. $P<0.05$ olduğunda önemli farklılıklar çizelgelerde farklı harflerle gösterilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

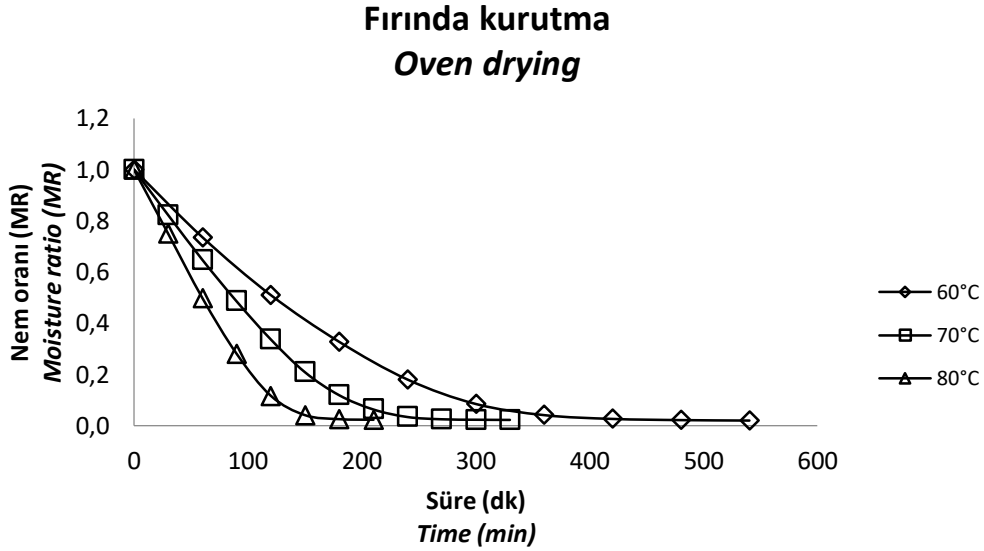
Hibiskus çanak yapraklarının kurutma kinetiği

Hibiskus çanak yaprakları için farklı yöntem ve koşullar kullanılarak elde edilen kurutma eğrileri (MR değerlerine karşı zaman), Şekil 1 ve Şekil 2'de sunulmuştur. Kurutma eğrileri incelendiğinde hibiskus örneklerinin nem oranının (MR) önceki çalışmalarla uyumlu olarak kuruma süresi arttıkça azaldığı görülmektedir (Saeed, 2010; Evin, 2011).

Örneklerin kurutulması için gerekli süre, T60, T70 ve T80 örnekleri için sırasıyla 540, 330 ve 210 dk olarak belirlenirken, MW180, MW300 ve MW450 örnekleri için ise sırasıyla 45, 33 ve 20 dk olarak belirlenmiştir. Hedeflenen nem değerine ulaşmak için gerekli sürenin sıcaklık (60°C'den 80°C'ye) ve mikrodalga gücü (180W'tan 450W'a) artışıyla tahmin edilebileceği üzere azaldığı görülmektedir.

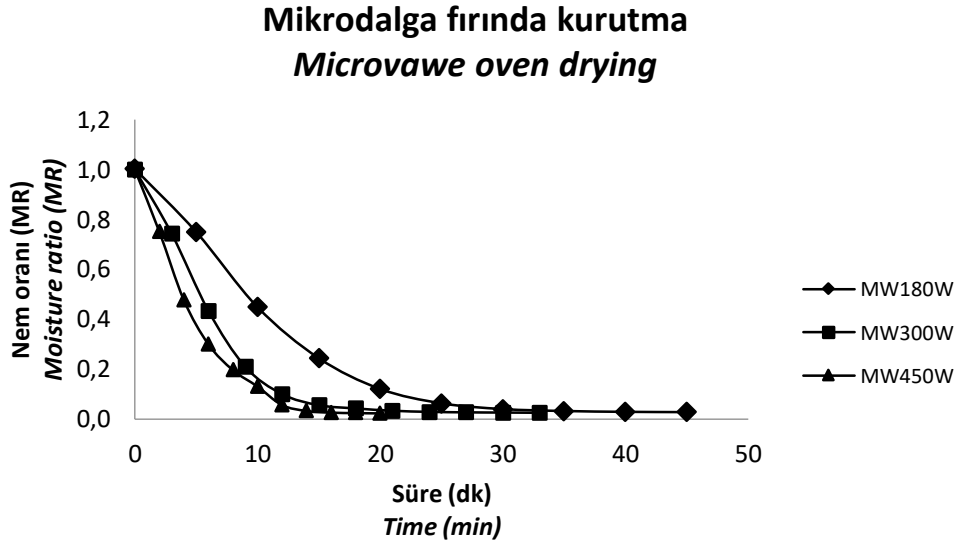
Tekgül ve Çalışkan Koç (2020)'un arapsaçı otu ve Özkan vd (2007)'nin ıspanakta yaptıkları çalışmalarda da benzer şekilde sıcaklık ve

mikrodalga güç seviyesinin artışıyla kurutma süreleri önemli düzeyde azalmıştır.



Şekil 1. Fırında farklı sıcaklıklarda kurutulan hibiskus örneklerinin nem oranlarının kurutma süresi ile değişimi.

Figure1. The change of the moisture ratio (MR) of hibiscus samples dried in oven at different temperatures with drying time



Şekil 2. Mikrodalga fırında farklı güç seviyelerinde kurutulan hibiskus örneklerinin nem oranlarının kurutma süresi ile değişimi

Figure2. The change of the moisture ratio (MR) of hibiscus samples dried in microwave oven at different temperatures with drying time.

Modellerin hibiskus çanak yapraklarının kurutulmasında elde edilen verilere (Çizelge 1) uygunluğunu belirlemek için hesaplanan regresyon katsayıları (R^2), azaltılmış ki-kare (χ^2) ve hata kareler ortalaması (RMSE) değerleri, Çizelge 2'de sunulmuştur. Fırında kurutulan hibiskus örneklerinde modellerin hesaplanan R^2 değerleri

0.9708 ile 0.9986 arasında belirlenirken, χ^2 ve RMSE değerleri ise sırasıyla 0.0002 ile 0.0041 ve 0.0138 ile 0.0641 arasında tespit edilmiştir. Mikrodalga yöntemiyle kurutulan örnekler için R^2 , χ^2 ve RMSE değerleri ise sırasıyla 0.9400 ile 1.0000, 0.0001 ile 0.5156 ve 0.0022 ile 0.0844 arasında hesaplanmıştır.

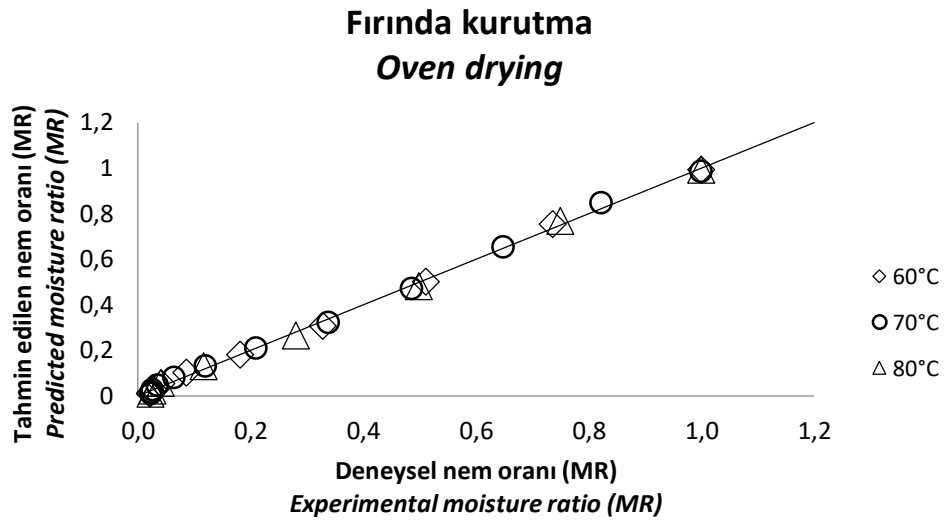
Çizelge 2. Çeşitli kurutma teknikleriyle kurutulan hibiskus örneklerinin kurutma verileri için kullanılan kinetik modellerin parametreleri.

Table 2. Parameters of kinetic models used for drying data of hibiscus samples dried by various drying techniques.

Matematiksel model <i>Mathematical model</i>	Parametreler <i>Parameters</i>	Kurutma metodu <i>Drying method</i>					
		T60	T70	T80	MW 180	MW 300	MW 450
Lewis	R^2	0.9856	0.9739	0.9708	0.9825	0.9812	0.9916
	χ^2	0.0017	0.0031	0.0040	0.0021	0.0020	0.0009
	RMSE	0.0416	0.0558	0.0636	0.0461	0.0450	0.0306
Henderson ve Pabis <i>Henderson and Pabis</i>	R^2	0.9876	0.9790	0.9746	0.9852	0.9836	0.9931
	χ^2	0.0017	0.0028	0.0041	0.0020	0.0019	0.0009
	RMSE	0.0409	0.0525	0.0641	0.0450	0.0441	0.0292
Page	R^2	0.9986	0.9982	0.9983	0.9983	0.9965	0.9988
	χ^2	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002	0.0004	0.0002
	RMSE	0.0138	0.0155	0.0165	0.0154	0.0205	0.0124
İki-terimli <i>Two-term</i>	R^2	0.9953	0.9902	0.9923	0.9985	0.9972	0.9992
	χ^2	0.0008	0.0016	0.0019	0.0003	0.0004	0.0001
	RMSE	0.0291	0.0401	0.0432	0.0162	0.0205	0.0116
İki-terimli üssel <i>Two-term exponential</i>	R^2	0.9981	0.9965	0.9963	0.999	0.9974	0.9989
	χ^2	0.0003	0.0005	0.0006	0.0001	0.0003	0.0001
	RMSE	0.0162	0.0214	0.0246	0.0119	0.0175	0.0117
Logaritmik <i>Logarithmic</i>	R^2	0.9928	0.9893	0.9879	0.9871	0.9837	0.9947
	χ^2	0.0011	0.0016	0.0024	0.0020	0.0021	0.0007
	RMSE	0.0332	0.0396	0.0486	0.0449	0.0463	0.0272
Wang ve Singh <i>Wang and Singh</i>	R^2	0.9970	0.9980	0.9968	0.9861	0.9467	0.9861
	χ^2	0.0004	0.0003	0.0005	0.0019	0.0063	0.0017
	RMSE	0.0200	0.0164	0.0228	0.0434	0.0795	0.0416
Modifiye Henderson ve Pabis <i>Modified Henderson and Pabis</i>	R^2	0.9953	0.9902	0.9923	0.999	0.9986	0.9992
	χ^2	0.0013	0.0021	0.0037	0.0003	0.0003	0.0002
	RMSE	0.0356	0.0463	0.0611	0.0164	0.0168	0.0137
Midilli vd. <i>Midilli and others</i>	R^2	0.9986	0.9983	0.9984	1.0000	0.9997	0.9991
	χ^2	0.0002	0.0003	0.0004	0.0505	0.5156	0.0001
	RMSE	0.0156	0.0166	0.0199	0.0022	0.0072	0.0121
Verma	R^2	0.9953	0.9902	0.9923	0.9985	0.9972	0.9992
	χ^2	0.0007	0.0014	0.0015	0.0002	0.0004	0.0001
	RMSE	0.0269	0.0378	0.0386	0.0150	0.0193	0.0108
Difüzyon yaklaşımı <i>Diffusion approach</i>	R^2	0.9953	0.9902	0.9883	0.9873	0.9836	0.9992
	χ^2	0.0007	0.0014	0.0023	0.0020	0.0022	0.0001
	RMSE	0.0269	0.0378	0.0477	0.0445	0.0465	0.0108
MR'ın kökü <i>Root of MR</i>	R^2	0.9972	0.9982	0.9973	0.9844	0.9400	0.9874
	χ^2	0.0004	0.0002	0.0004	0.0021	0.0071	0.0016
	RMSE	0.0195	0.0156	0.0209	0.0460	0.0844	0.0396
Modifiye Page <i>Modified Page</i>	R^2	0.9986	0.9982	0.9983	0.9983	0.9965	0.9988
	χ^2	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002	0.0004	0.0002
	RMSE	0.0138	0.0155	0.0165	0.0154	0.0205	0.0124

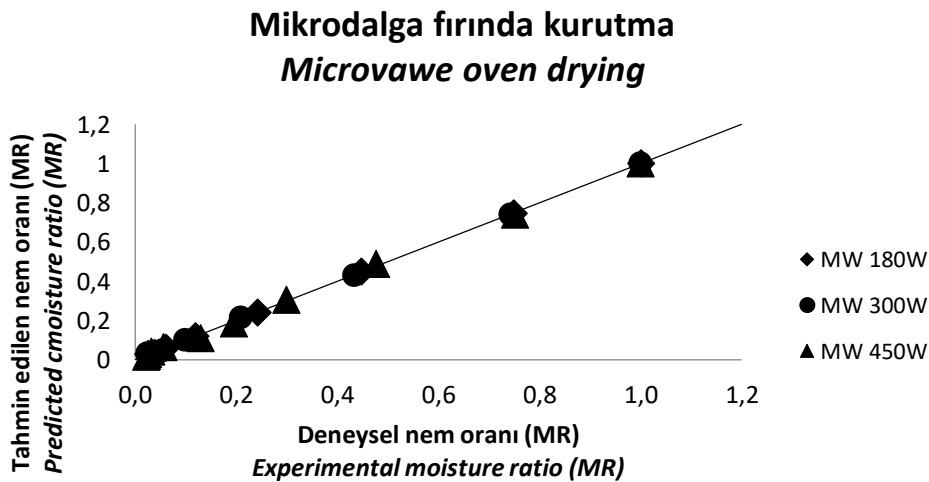
Yüksek R^2 ile düşük χ^2 ve RMSE değerleri, modellerin verilere uygunluğunu ifade etmektedir. Bu nedenle hem fırında ($R^2 \geq 0.9983$; $\chi^2 \leq 0.0004$; $RMSE \leq 0.0199$) hem de mikrodalga yöntemiyle ($R^2 \geq 0.9991$; $\chi^2 \leq 0.5156$; $RMSE \leq 0.0193$) kurutulan örneklerde verilere en iyi

uyumu Midilli vd. modeli sergilemiştir (Çizelge 2). Nitekim Şekil 3 ve Şekil 4'te sunulan deneysel veriler ile tahmin edilen veriler karşılaştırıldığında, Midilli vd. modelinin hibiskus örneklerinin kurutma karakteristiğini tahmin etmede oldukça başarılı olduğu görülmektedir.



Şekil 3. Farklı sıcaklıklarda fırında kurutulan örneklerin nem oranı değişimlerinin Midilli vd. modeli için deneysel ve tahmin edilen değerleri

Figure 3. Experimental and predicted values of moisture content changes of samples dried in the oven at different temperatures for the Midilli and others model



Şekil 4. Farklı güç seviyelerinde mikrodalga fırında kurutulan örneklerin nem oranı değişimlerinin Midilli vd. modeli için deneysel ve tahmin edilen değerleri.

Figure 4. Experimental and predicted values of moisture content changes of samples dried in microwave oven at different power levels for the Midilli and others model.

Saeed (2010) hibiskus çanak yapraklarını güneş kolektörlü sistemde farklı sıcaklık (35, 45, 55, 60, ve 65°C) ve hava hızlarında (1.5 ve 3.0 m/s) kuruttuğu çalışmasında örneklerin kurutma karakteristiğini tahmin etmede (Newton, Page, Modified Page, Modified Page II, Henderson ve Pabis, Modifiye Henderson and Pabis, Logarithmic, basitleştirilmiş Fick'in difüzyonu, iki terimli ve iki terimli üssel) on iki model değerlendirmiştir. Değerlendirilen modeller arasında en iyi uyumu Logaritmik modelin gösterdiği rapor edilmiştir.

Diğer taraftan Ismail vd., (2019) hibiskus tohumlarını fırında farklı sıcaklıklarda (35, 45, 55, 60 ve 65°C) kuruttukları çalışmalarında beş matematiksel modelin (Newton, Page, Henderson ve Pabis, difüzyon yaklaşımı ve Logarithmic) kurutma verilerine uyumunu araştırmışlardır. Çalışmada 240 dk kurutma süresi ile 65 °C

sıcaklığın en uygun kurutma sıcaklığı olduğu ve difüzyon yaklaşımının kurutma verilerine en uyumlu model olduğu rapor edilmiştir.

Çizelge 3'te en uyumlu model olarak belirlenen Midilli vd. modeline ait kinetik parametreler sunulmuştur. Fırında kurutulan hibiskus örneklerinde Midilli vd. modeli için hesaplanan k değerinin 0.0011 ile 0.0016 arasında değiştiği belirlenirken mikrodalga yöntem ile kurutulan örneklerde Midilli vd. modeli için hesaplanan k değeri ise 0.0288 ile 0.1292 arasında belirlenmiştir.

Mikrodalga yöntemiyle kurutulmuş örneklerde k değeri, mikrodalga gücün artışıyla artmıştır. Bununla birlikte, fırında 60 ve 70 °C'de kurutulan örneklerin k değeri birbirlerine oldukça yakın değerlerde (sırasıyla 0.0012 ve 0.0011) belirlenirken 80 °C'de kurutulan örneklerde k değeri 0.0016 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Farklı yöntemler ile kurutulmuş hibiskus örnekleri için Midilli vd. modelinin kinetik parametreleri.

Table 3. Kinetic parameters of Midilli and others model for hibiscus samples dried by different drying techniques.

Matematiksel model <i>Mathematical Model</i>	Kurutma metodu Drying methods	Model sabitleri Model constants			
		a	k	n	b
<i>Midilli vd.</i>	60°C	0.9933	0.0012	1.3201	6.4902x10 ⁻⁶
<i>Midilli and others</i>	70°C	0.9859	0.0011	1.4450	6.9995x10 ⁻⁶
	80°C	0.9930	0.0016	1.4921	6.2470x10 ⁻⁷
	MW 180W	1.0014	0.0288	1.4513	0.0006
	MW 300W	1.0010	0.0588	1.4953	0.0010
	MW 450W	1.0027	0.1292	1.2429	0.0007

Saeed, (2010) hibiskus çanak yapraklarını güneş kolektörlü sistemde kuruttuğu çalışmasında Newton, Page, Modified Page, Modified Page II, Henderson ve Pabis, Modifiye Henderson and Pabis, basitleştirilmiş Fick'in difüzyonu ve iki terimli üssel model için hesaplanan k değerlerini 0.00077 ile 0.00618 arasında rapor etmiştir.

Fizikokimyasal özellikler

Kurutulmuş örneklerin daha çok sulu ekstraktlarının kullanımı göz önüne alınarak hazırlanmış ekstraktlarda gerçekleştirilen renk ve bulanıklık ölçüm sonuçları Çizelge 4'te

sunulmuştur. Örneklerin renk değerlerinin uygulanan kurutma yöntemlerine göre önemli bir değişim göstermediği L*, a*, b* C ve h değerlerinin sırasıyla 15.10-15.22, 3.38-3.63, 4.64-4.88, 5.75-6.08 ve 52.94-54.21 arasında değiştiği belirlenmiştir. Wong vd., (2003) taze hibiskus çanak yapraklarında sıcak su ekstraksiyonu, vidalı pres, blendırda sıcak (100 °C) ve soğuk (27 °C) su ekstraksiyonu olmak üzere farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kalite özellikleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında örneklerin L değerinin 22.5-29.8, a değerinin 13.3-18.5 ve b değerinin 4.08-5.47 arasında değiştiğini

bildirmişlerdir. Ramirez-Rodrigues vd. (2011) ise farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirdikleri ekstraksiyon çalışmasında hibiskus örneklerinin L, a, b renk değerlerini sırasıyla 35.26-54.18, 63.93-67.65 ve 45.39-68.76 arasında rapor etmişlerdir.

Antosiyanince zengin hibiskus ekstraktlarının farklı içeceklerde kullanımı göz önüne alındığında, kurutma işleminin antosiyaninler ve ekstraktlardaki bulanıklık değerleri üzerine etkisi bu kapsamda önem arz etmektedir. Nitekim

mikrodalga yöntemiyle kurutulan örnekler ile hazırlanan ekstraktların bulanıklık değerlerinin (4.24-5.46 NTU) fırında kurutulan örneklerin ekstraktlarından (6.78-7.43 NTU) genel olarak daha düşük değerlerde ölçüldüğü görülmektedir (Çizelge 4). Dinçer vd., (2020)'nin aktardan temin edilen hibiskus örneklerini termal ve ultrases yöntemi ile ekstrakte ettikleri çalışmada, 1.1 °Bx seviyesindeki ekstraktların bulanıklık değerlerinin 10.31 ile 18.23 NTU aralığında değişim gösterdiği rapor edilmiştir.

Çizelge 4. Farklı yöntemler ile kurutulmuş örneklerden hazırlanan ekstraktların renk ve bulanıklık değerleri

Table 4. Color and turbidity values of extracts prepared from samples dried by different methods

Kurutma metodu Drying methods	L*	a*	b*	C	h	NTU
60°C	15.22 ^a ±0.07	3.60 ^a ±0.11	4.85 ^a ±0.07	6.04 ^a ±0.12	53.41 ^a ±0.43	7.05 ^a ±0.99
70°C	15.10 ^a ±0.04	3.39 ^a ±0.09	4.64 ^a ±0.07	5.75 ^a ±0.11	53.91 ^a ±0.41	7.43 ^a ±0.45
80°C	15.10 ^a ±0.05	3.43 ^a ±0.02	4.70 ^a ±0.02	5.82 ^a ±0.01	53.88 ^a ±0.24	6.78 ^{ab} ±1.21
MW180W	15.10 ^a ±0.04	3.38 ^a ±0.06	4.68 ^a ±0.03	5.77 ^a ±0.03	54.21 ^a ±0.55	4.68 ^{bc} ±0.21
MW300W	15.17 ^a ±0.00	3.60 ^a ±0.06	4.77 ^a ±0.06	5.98 ^a ±0.02	52.94 ^a ±0.76	5.46 ^{abc} ±0.13
MW450W	15.10 ^a ±0.05	3.63 ^a ±0.13	4.88 ^a ±0.12	6.08 ^a ±0.17	53.21 ^a ±0.48	4.24 ^c ±0.23

Aynı sütündeki farklı harfler örnekler arası farkın istatistiksel olarak önemli (P<0.05) olduğunu gösterir. Ortalama değer ± standart hata

Different letters on the same column represent that the difference between the samples is statistically significant (P<0.05). Mean values ±standard error

Ekstraktların pH ve iletkenlik ölçümleri Çizelge 5'te sunulmuştur. Örneklerin pH değerlerinin (2.35-2.37) de uygulanan kurutma yöntemlerine göre önemli bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Chumsri vd., (2008) taze ve kurutulmuş hibiskus çanak yapraklarını farklı sıcaklık (50, 60 °C), süre (30, 60 dk) ve katı/çözücü oranlarında (1/5, 1/10) suda ekstrakte ettiği çalışmada, örneklerin pH değerinin 2.79 ile 2.95 arasında belirlendiğini bildirmişlerdir. Ramirez-Rodrigues vd. (2011) ise katı/çözücü oranı 1/40 ve 25 °C'de 30, 60, 120 ve 240 dk ile 90 °C'de 2, 4, 8, 16 dk olmak üzere farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirdikleri çalışmada hibiskus örneklerinin sulu ekstraktlarının pH değerlerini, sunulan çalışmanın sonuçlarıyla oldukça uyumlu olarak, 2.31-2.37 arasında rapor etmiştir. Dinçer vd., (2020)'de termal ve ultrases yöntemi ile 1.1 °Bx seviyesine kadar ekstrakte ettikleri hibiskus örneklerinde pH değerlerini 2.41-2.42 aralığında bildirmişlerdir. Örneklerin iletkenlik değerlerinin (2.35-2.46 ms/cm) ise

istatistiki açıdan farklılık ortaya koyduğu (P<0.05) ancak bu farklılığın kurutma yöntemi ve şartlarına göre net bir eğilim yansıtmadığı görülmektedir. Diğer taraftan sıvı gıdaların iletkenliğinin vitaminler, mineraller, yağ asitleri ve proteinler gibi besin maddelerinden kaynaklandığı ifade edilmekle birlikte (Aadil vd., 2013) iletkenliğin, ohmik ısıtma, ultrason, darbeli elektrik alanları, radyo frekanslı ısıtma veya mikrodalga ısıtma ile gıdaların işlenmesi açısından önem arz ettiği bildirilmektedir (Siguemoto ve Gut, 2016).

Hibiskus ekstraktlarının ve ekstraktların hazırlandığı kurutulmuş örneklerin antosiyanin ve fenolik madde içerikleri de Çizelge 5'te sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde farklı kurutma şartlarının örneklerin antosiyanin ve fenolik madde içeriğinde de önemli bir değişime neden olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte kurutulmuş hibiskus örneklerinin antosiyanin içeriğinin 2.72 ile 3.19 siyanidin-3glikozid g/kg kuru madde, fenolik madde içeriğinin ise 18.53 ile

20.78 g GAE/kg kuru madde arasında değişim gösterdiği görülmektedir (Çizelge 5). Borrás-Linares vd., (2015) Meksikada yetişen 25 farklı *Hibiscus sabdariffa* varyetesi ile gerçekleştirdikleri çalışmada örneklerin fenolik madde içeriğinin

2400-10000 mg GAE/100g km (24-100 g GAE/kg km) antosiyanin içeriğinin ise 0-4408 mg/100g km (0-44.08 g/kg) arasında değişim gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Çizelge 5. Hibiskus örneklerinin pH ve iletkenlik değerleri ve antosiyanin ve toplam fenolik madde içerikleri

Table 5. pH and conductivity values and anthocyanin and total phenolic contents of hibiscus samples

Kurutma medtodu Drying methods	pH	İletkenlik Conductivity (ms/cm)	Antosiyanin	Antosiyanin	Fenolik	Fenolik
			(siyanidin-3- glikozid mg/L) Anthocyanin content (cyanidine-3- glucoside mg/L)	(siyanidin-3- glikozid g/kg km) Anthocyanin content (cyanidine-3- glucoside mg/L dm)	madde miktarı (mg GAE/L) Phenolic content (mg GAE/L)	madde miktarı (g GAE/kg km) Phenolic content (g GAE/kg dm)
60°C	2.36 ^a ±0.01	2.38 ^{bc} ±0.01	23.43 ^a ±0.92	2.78 ^a ±0.11	156.18 ^a ±4.97	18.53 ^a ±0.59
70°C	2.36 ^a ±0.01	2.41 ^{abc} ±0.02	25.61 ^a ±1.43	3.03 ^a ±0.15	157.41 ^a ±5.01	18.64 ^a ±0.57
80°C	2.36 ^a ±0.01	2.41 ^{ab} ±0.02	25.99 ^a ±1.16	3.11 ^a ±0.14	164.35 ^a ±3.74	19.71 ^a ±0.45
MW180W	2.35 ^a ±0.01	2.35 ^c ±0.02	25.91 ^a ±0.89	3.19 ^a ±0.11	171.60 ^a ±3.64	20.78 ^a ±0.72
MW300W	2.37 ^a ±0.01	2.46 ^a ±0.02	24.66 ^a ±0.98	3.04 ^a ±0.12	167.90 ^a ±0.16	20.33 ^a ±0.36
MW450W	2.36 ^a ±0.01	2.36 ^{bc} ±0.02	22.74 ^a ±0.52	2.72 ^a ±0.06	166.05 ^a ±2.27	19.89 ^a ±0.27

Aynı sütundaki farklı harfler örnekler arası farkın istatistiksel olarak önemli (P<0.05) olduğunu gösterir.

Ortalama değer ± standart hata, km: kuru madde

Different letters on the same column represent that the difference between the samples is statistically significant (P<0.05). Mean values ±standard error, dm:dry basis

SONUÇ

Çalışma kapsamında kesikli mikrodalga fırında farklı güç seviyelerinde ve fırında farklı sıcaklıklarda kurutulan hibiskus çanak yapraklarının kurutma verilerine en iyi uyumu sağlayan modelin Midilli vd. olduğu belirlenmiştir. Ayrıca mikrodalga fırında kesikli olarak 180-450 W gücünde gerçekleştirilen kurutma işleminin (45-20 dk) fırında 60-80 °C’de gerçekleştirilen kurutma işlemine (540-210 dk) göre kurutma süresini yaklaşık 10 kat kısalttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte mikrodalga fırında 180, 300 ve 450W’ta ve geleneksel yöntemi temsilen 60, 70 ve 80 °C’de fırında kurutulan örneklerin pH, iletkenlik, renk, bulanıklık, antosiyanin ve fenolik madde içeriği gibi kalite özelliklerinde de önemli farklılıklar tespit edilmemiştir. Mikrodalga fırındaki işlem sürelerinin geleneksel fırına kıyasla önemli düzeyde kısa olması ve bu işlemin kalite özelliklerinde önemli bir değişime neden olmaması kullanımını cazip kılmaktadır. Özellikle *Hibiscus sabdariffa*’nın gıda sanayiindeki kullanım

potansiyeli ve biyoaktif bileşenlerine bağlı olarak sağlık açısından faydaları göz önüne alındığında, Antalya şartlarında yetiştirilen bitkinin geleneksel fırınların yanında mikrodalga fırın ile de başarıyla kurutulabileceği ve kurutma karakteristiklerinin tanımlanmasında Midilli vd. modelinin başarıyla kullanılabilceği ifade edilebilir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar tarafından bildirilen herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

YAZARLARIN KATKISI

Ahu ÇINAR bitkilerin yetiştirilmesi, hasat edilmesi, denemenin kurulması ve makalenin yazım sürecinde, Safınaz ELMASULU, bitkilerin hasat edilmesi, denemenin kurulması, kurutma işlemleri, analizler ve makalenin yazım sürecinde, Cüneyt DİNÇER denemenin kurulması, kurutma işlemleri, analizler, istatistik değerlendirme ve makalenin yazım sürecinde görev almıştır.

KAYNAKLAR

- Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chem.*141(3), 3201-3206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.008>
- Aykın-Dinçer, E., Kılıç-Büyükkurt, Ö., Erbaş, M. (2020). Influence of drying techniques and temperatures on drying kinetics and quality characteristics of beef slices. *Heat and Mass Transfer*, 56(1), 315-320. <https://doi.org/10.1007/s00231-019-02712-z>
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., ... Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Ind. Crops Prod.* 69, 385-394. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.02.053>
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., Basak, T. (2013). Microwave food processing—A review. *Food Res. Int.* 52(1), 243-261. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.033>
- Chumsri, P., Sirichote, A., Itharat, A. (2008). Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarın J. Sci. Technol.* 30(1), 133-9.
- Cid-Ortega, S., Guerrero-Beltrán, J. A. (2015). Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52(11), 6859-6869. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1800-9>
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* 165, 424-443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>
- Daniel, D. L., Huerta, B. B., Sosa, I. A., Mendoza, M. V. (2012). Effect of fixed bed drying on the retention of phenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Ind. Crops Prod.* 40, 268-276. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.03.015>
- Delgado, T., Pereira, J. A., Baptista, P., Casal, S., Ramalhosa, E. (2014). Shell's influence on drying kinetics, color and volumetric shrinkage of *Castanea sativa* Mill. fruits *Food Res. Int.* 55, 426-435. doi:10.1016/j.foodres.2013.11.043
- Dinçer, C., Tongur, T., Erkeymaz, T. (2020). Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin hibiskus ekstraktlarının kalite özellikleri üzerine etkisinin araştırılması. *Gıda*, 45(3), 409-420. <https://doi.org/10.15237/gida.GD19155>
- Evin, D. (2011). Microwave drying and moisture diffusivity of white mulberry: experimental and mathematical modeling. *J.Mech. Sci. Technol.*, 25(10), 2711. <https://doi.org/10.1007/s12206-011-0744-x>
- Gedik, S. (2014). Çukurova koşullarında farklı ekim zamanlarının kerkede (*Hibiscus sabdariffa* L.) bitkisinin çanak yaprak verimi ve kalitesine etkisi. Çukurova Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Y.lisans Tezi.116s.
- Ismail, N. F., Nawi, H. M., Zainuddin, N. (2019, November). Mathematical modelling of drying kinetics of oven dried *Hibiscus Sabdariffa* seed. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1349, No. 1, p. 012144). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1349/1/012144>
- Kumar, C., Joardder, M. U. H., Farrell, T. W., Millar, G. J., Karim, M. A. (2016). Mathematical model for intermittent microwave convective drying of food materials. *Drying Technol.* 34(8), 962-973. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1087408>
- Midilli, A., Kucuk, H., Yapar, Z. (2002). A new model for single-layer drying. *Drying Technol.* 20(7), 1503-1513. <https://doi.org/10.1081/DRT-120005864>
- Özdemir, M., Devres, Y. O. (1999). The thin layer drying characteristics of hazelnuts during roasting. *J.Food Eng.*, 42(4), 225-233. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00126-0)
- Özdoğan F. P. (2001) *Hibiscus sabdariffa*'nın fitoterapi açısından değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Eczacılık ve Farmakoloji. Yüksek Lisans175s,

- Ramirez-Rodrigues, M. M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O., Marshall, M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Food Sci.*, 76(3), C428-C435. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02091.x>
- Saeed, I. E. (2010). Solar drying of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Effects of drying conditions on the drying constant and coefficients, and validation of the logarithmic model. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 12(1):167-181.
- Siguemoto, É. S., Gut, J. A. W. (2016). Dielectric properties of cloudy apple juices relevant to microwave pasteurization. *Food Bioprocess Technol.* 9(8), 1345-1357. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1723-0>
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem.* 89(2), 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025>
- Swain, S., Samuel, D. V. K., Bal, L. M., Kar, A., Sahoo, G. P. (2012). Modeling of microwave assisted drying of osmotically pretreated red sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Food Sci. Biotechnol.* 21(4), 969-978. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0127-9>
- Tajchakavit, S., Boye, J.I., Belanger, D. Couture, R. 2001. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. *Food Res. Int.* 34 (5): 431-440. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00188-5)
- Tekgül, Y., Koç, G. Ç. (2020). Arapsacı otunun (*Foeniculum vulgare*) kuruma kinetiğinin incelenmesi ve kuruma davranışının modellenmesi. *Gıda*, 45(4), 676-688. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20044>
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J. (2008). Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *J. Agric. Food. Chem.*, 56(7), 2423-2428. <https://doi.org/10.1021/jf073503y>
- Özkan, I. A., Akbudak, B., Akbudak, N. (2007). Microwave drying characteristics of spinach. *J. Food Eng.* 78(2), 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.026>
- Vega-Gálvez, A., Puente-Díaz, L., Lemus-Mondaca, R., Miranda, M., Torres, M. J. (2014). Mathematical Modeling of Thin-Layer Drying Kinetics of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *J. Food Process. Preserv.* 38(2), 728-736. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12024>
- Wang, W.D. Xu, S.Y. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *J. Food Eng.* 82 (3): 271-275. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.018>
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., & Man, C. (2003). Optimization of hot water extraction of roselle juice using response surface methodology: a comparative study with other extraction methods. *J. Sci. Food Agric.*, 83(12), 1273-1278. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1416>
- Yaldiz, O., Ertekin, C. (2001). Thin layer solar drying of some vegetables. *Drying Technology*, 19(3-4), 583-597. <https://doi.org/10.1081/DRT-100103936>
- Zielinska, M., Michalska, A. (2016). Microwave-assisted drying of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits: Drying kinetics, polyphenols, anthocyanins, antioxidant capacity, colour and texture. *Food Chem.*, 212, 671-680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.003>



SÜTÜN MİKROBİYOTASI VE BOZULMASINA YOL AÇAN ÖNEMLİ BAKTERİLER

Cem Sezai Başar^{1*} Zeynep Dilek Heperkan²

1 İstanbul Aydın Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Gıda Güvenliği ve Beslenme Programı, İstanbul, Türkiye

2 İstanbul Aydın Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

Geliş / Received: 31.01.2021; Kabul / Accepted: 18.03.2021; Online baskı / Published online: 23.04.2021

Başar, C.S., Heperkan. Z.D. (2021). Sütün mikrobiyotası ve bozulmasına yol açan önemli bakteriler. *GIDA* (2021) 46 (3) 660-668 doi: 10.15237/gida.GD21034

Başar, C.S., Heperkan. Z.D. (2021). *Milk microbiota and its important spoilage bacteria*. *GIDA* (2021) 46 (3) 660-668 doi: 10.15237/gida.GD21034

ÖZ

Süt sağımdan başlayarak işleninceye kadar çeşitli ortamlardan, ekipmanlardan ve personelden bulaşan mikroorganizmalar nedeniyle bozulur. Süt mikrobiyotasında laktik asit bakterileri, psikrotrofik Gram negatif bakteriler, Gram pozitif sporlu bakteriler ve patojen bakteriler bulunur. Bu bakteri ve enzimlerin faaliyeti sütün duyuşal ve yapısal özelliklerini değiştirerek bozulmasına neden olur. Çiğ süt mikrobiyotası hem sütün hem de süt ürünlerinin kalite ve güvenliğini etkileyen en önemli parametrelerden birisi olup, bir taraftan çiftlik ortamını yansıtırken, diğer taraftan sağım ve işletme koşulları hakkında da fikir verir. Çiğ sütte sıklıkla bulunan ve sütün bozulmasına yol açan en önemli bakteriler *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium* ve bazı koliform üyeleridir. Sütün bozulmasında pastörizasyon öncesi bulaşmaların yanında pastörizasyon sonrası bulaşmalara bağlı mikroorganizma faaliyeti de önemli rol oynar. Özellikle psikrotrofik termofilik karakterdeki *Bacillus* türleri pastörizasyondan sonra meydana gelen bozulmalardan sorumludur. Bu makalede, sütün mikroorganizmalarla bulaşma yolları, sütte bulunan mikroorganizmaların özellikleri ve sütün bozulmasındaki rolleri konusunda bilgiler sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyel bozulma, süt, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*

MILK MICROBIOTA AND ITS IMPORTANT SPOILAGE BACTERIA

ABSTRACT

Milk spoils due to microorganisms transmitted from environments, equipment and personnel starting from milking to process. Lactic acid bacteria, psychrotrophic Gram negative bacteria, Gram positive spore-forming bacteria and pathogenic bacteria are present in the milk microbiota. The activity of these bacteria and enzymes changes the sensory and structural properties of milk, causing it to spoil. Milk microbiota is one of the most important parameters affecting the quality and safety of both milk and dairy products. Bacteria found in milk that cause milk spoilage are *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Flavobacterium* and some coliform members. Besides contamination before and after pasteurization, microorganism activity also plays an important role in spoiling milk. Especially, *Bacillus* species with psychrotrophic thermophilic character are responsible for the deterioration that occurs after pasteurization. In this article, information on the ways of contamination of milk with

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: csezaibasara@stu.aydin.edu.tr

☎: +90 532 468 5987

Cem Sezai Başar; ORCID no: 0000-0001-8915-9576

Zeynep Dilek Heperkan; ORCID no: 0000-0001-7801-9607

microorganisms, the characteristics of microorganisms as well as their roles in milk spoilage are presented.

Keywords: Microbial spoilage, milk, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*

GİRİŞ

Süt, zengin besin içeriği ve uygun yapısal özellikleri nedeniyle pek çok mikroorganizmanın gelişmesine uygun bir gıda maddesidir. Mikroorganizma yükü ne kadar yüksek ise süt o kadar kısa sürede bozulur. Mikroorganizma sayısı ile birlikte sütün bozulmasını etkileyen bir diğer önemli faktör sıcaklıktır. Sıcaklık ile bozulma doğru orantılı olup, sıcaklık arttıkça sütün bozulması hızlanır, başka bir ifadeyle sıcaklık yükseldikçe süt daha çabuk bozulur. Süt, sağım sırasında meme kanalı, personel, sağımda kullanılan kaplar veya sağım makinesi, tank ve depolardan kaynaklanan, çok sayıda ve çeşitli mikroorganizmalarla bulaşabilir (Nieminen vd., 2007). Çiğ süt mikrobiyotası bir taraftan çiftlik ortamını yansıtırken, diğer taraftan sağım ve işletme koşulları hakkında da fikir verir. Süt hayvanları, barnaklar ve meraların temiz ve bakımlı olması, sağımın hijyenik koşullarda yapılması, sütün soğutulması ve soğuk zincirin korunması, işletmenin sanitasyon kurallarına uygun şekilde tasarım ve üretimi, sütte mikroorganizma sayısının önemli derecede düşük olmasını ve dolayısıyla süt kalitesinin yüksek olmasını sağlar (Douset vd., 2016; Martin vd., 2019). Genel görüş olarak, meme içindeyken sütün mikroorganizma içermediği, sütte bulunan mikroorganizmaların sağım ile birlikte meme derisi, dış ortam veya yavruların ağız boşluğundan kaynaklandığı düşünülüyordu. Son yıllarda yapılan çalışmalar ise meme bezi içinde endojen bir mikrobiyotanın varlığını göstermektedir (Addis vd., 2016; Fusco vd., 2020). İneklerde bağırsak bakterilerinin meme bezine geçişi metagenomik araştırmalar ile kanıtlanmıştır (Young vd., 2015). Sağlıklı, emziren ineklerde dışkı, süt lökositleri ve kan lökositleri mikrobiyotasında yer alan *Ruminococcus*, *Bifidobacterium* cinsleri ve *Peptostreptococcaceae* ailesine ait türlerin ortak varlığı aynı hayvanlardan alınan örneklerle gösterilmiştir (Young vd., 2015). Bakterilerin, bağırsak lümenini terk ederek mezenterik lenf düğümlerinden meme bezine, muhtemelen dendritik hücreler gibi immün hücreler yoluyla geçebileceği böylece, memeden farklı anatomik bölgelerden bir şekilde

meme bezine girebileceği belirtilmiştir (Addis vd., 2016; Fusco vd., 2020). Sütün sağımı ve bunu izleyen taşıma, depolama, süt ürünlerine dönüştürme, pastörizasyon ve pastörizasyon sonrası aşamalar dahil geçirdiği tüm evrelerde meydana gelen değişiklikleri anlayabilmek ve değerlendirebilmek için çiğ sütün mikrobiyolojik kalitesinin bilinmesi çok önemlidir (Boor vd., 2017; Dortey vd., 2020). Bu makalede, sütün mikroorganizmalarla bulaşma yolları, sütte bulunan mikroorganizmaların özellikleri ve sütün bozulmasındaki rolleri konusunda son yıllarda yapılan çalışmalara ait bilgilerin sunulması amaçlanmıştır.

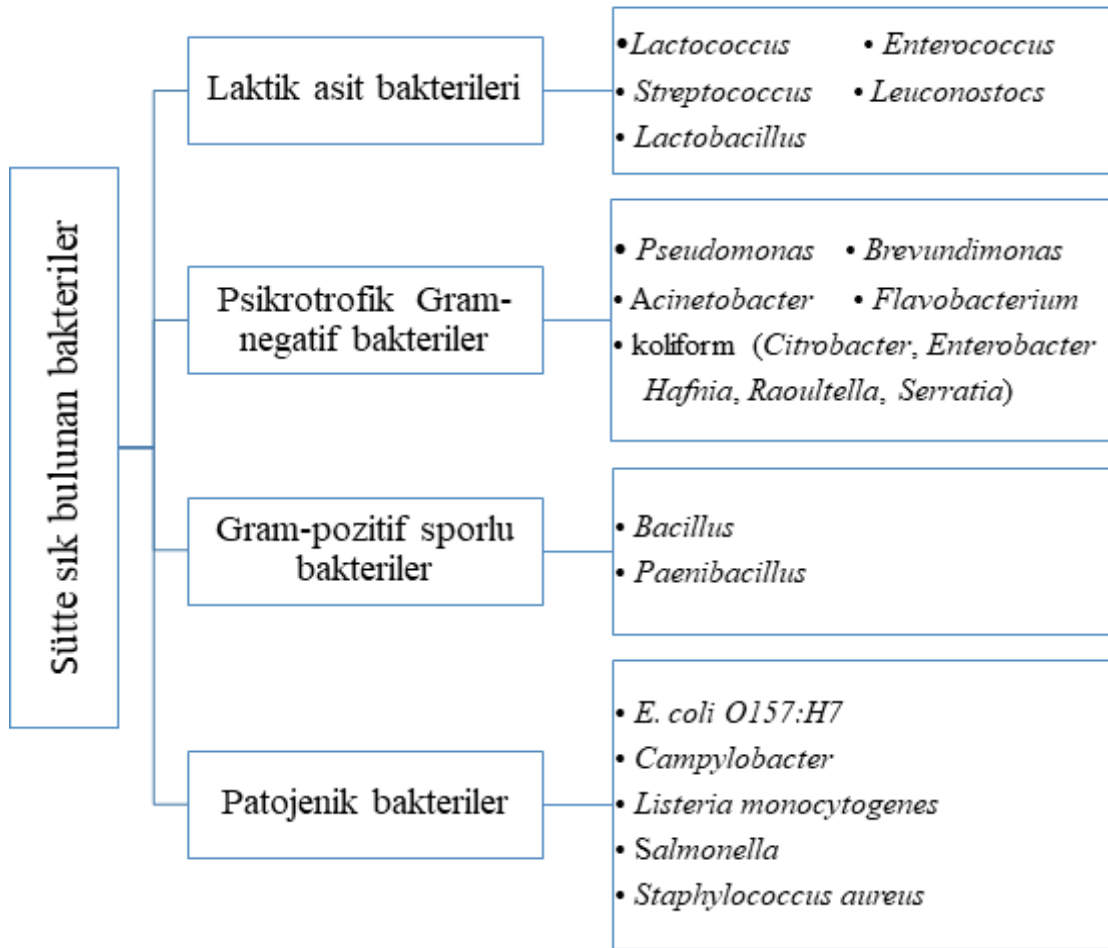
SÜTÜN BOZULMASI VE İLGİLİ MİKROORGANİZMALAR

Mikroorganizma faaliyetleri sonucunda meydana gelen bozulmalar ile süt ve fermente sütün yaklaşık %30'unun kayıp olduğu bildirilmiştir (Trmcic vd., 2015). Sütün bozulmasında pastörizasyon öncesi bulaşmaların yanında pastörizasyon sonrası bulaşmalara bağlı mikroorganizma faaliyeti de önemli rol oynar (Ryser vd., 2016). Pastörizasyon sonrası bulaşmaların süt endüstrisinde ciddi bir sorun olduğu, bu tip bulaşmanın daha çok perakende düzeyinde meydana geldiği ve tüketici hatalarının da önemli payı olduğu bildirilmiştir (Golan ve Buzby, 2015; Martin vd., 2018). Sütün mikroorganizmalar ile bulaşmasında meme bezi içindeki endojen mikrobiyotanın yanında dış ortamdaki örneğin sağım personel ve ekipmanları; süt taşıma ve depolama ekipmanları, hava, su, toprak, ot/yem gibi kaynaklar ve sütle beslenen yavruların ağız boşluğu rol oynar. Sütte bulunan mikroorganizmalar farklı araştırmacılar tarafından değişik kriterler dikkate alınarak sınıflandırılmaktadır. Örneğin bazı kaynaklarda süt mikrobiyotası, bakterilerin Gram boyamaya karşı gösterdikleri reaksiyonlara göre Gram pozitif ve Gram negatif olmak üzere 2 gruba ayrılarak incelenir (Trmcic vd., 2015; Lu vd., 2017). Diğer bazı kaynaklarda bozulma yapan, sporlu ve patojenik gibi bakterilerin fonksiyonel, morfolojik ve fayda-zarar özellikleri birlikte dikkate alınarak

sınıflandırma yapılmaktadır (Rodrigues vd., 2017). Literatürde karşılaşılan bir diğer sınıflandırma ise; pastörizasyon sonrası bulaşanlar ve psikrotolerant gram negatif bakteriler olmak üzere 2 grup halinde yapılır (Martín vd., 2012). Ancak, mikroorganizmaları tespit etmek için kullanılan yöntemler ve özellikle omik teknolojilerdeki gelişmeler çiğ sütün daha önce düşünülenlerden daha heterojen ve karmaşık bir mikrobiyotaya sahip olduğunu göstermiştir (Fusco vd., 2020). Bu makalede sütün özellikleri de göz önüne alınarak sütte bulunan bakteriler dört grup altında toplanmıştır; (i) laktik asit bakterileri (LAB), (ii) psikrotrofik Gram negatif bakteriler, (iii) Gram pozitif sporlu bakteriler ve (iv) patojenik bakteriler (Şekil 1).

LAKTİK ASİT BAKTERİLERİ

Çiğ sütte *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* ve *Leuconostoc* gibi laktik asit bakterileri bulunabilir (Rodrigues vd., 2017; Fusco vd., 2020). Sütte bulunan LAB içinde sayı bakımından en yüksek olan *Streptococcus* türleridir (Rodrigues vd., 2017). Soğuk zincirin kırılması veya sütün oda sıcaklığında bekletilmesi LAB'ın laktozu hidrolize ederek laktik asit oluşturmaya neden olur. Asit oluşumu sütte pH'nın düşmesine ve tadın ekşimesine yol açtığından içme sütünde LAB sayısının yüksek olması istenmeyen bir durumdur.



Şekil 1. Sütte sık bulunan bakteriler

Sütün soğutulması, pastörize edilmesi ve daha sonra soğukta depolanması LAB sayısında azalmayla sonuçlanır. Sütün aksine, peynir (Wyder vd., 2019) ve yoğurt gibi süt ürünlerinde ise LAB sayısının yüksek ve aktif olması, laktozu fermente etmesi ve bakterinin türüne ve üretilen fermente ürüne bağlı olarak başta asit olmak üzere diasetil, hidrojen peroksit ve bakteriyosin gibi metabolitleri üretmesi istenir. Laktik asit bakterilerinin dışında sütte *Propionibacterium*, *Microbacterium* ve *Micrococcus* gibi diğer sporsuz Gram pozitif bakteriler de bulunur (Trmcic vd., 2015; Holzapfel vd., 2020; Techer vd., 2020).

Çiğ süt gibi, pastörize sütün de bakterilerle bulaşması sık karşılaşılan bir durumdur. Pastörizasyondan sonra olan bulaşmalarda az da olsa laktik asit bakterilerinin de yer aldığı ve sütün bozulmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Örneğin ticari pastörizasyon veya laboratuvar pastörizasyonu olarak adlandırılan düşük sıcaklık-uzun süre (63°C/30 dk) uygulanmış sütlerden *Leuconostoc lactis*, *Lactococcus lactis* ve *Enterococcus* sp., düşük sıcaklık-kısa süre (72°C/25 s) uygulanmış sütlerden *Micrococcus* sp., *Streptococcus thermophilus* ve 77°C/25 s ısı işlem uygulanmış sütlerden *Staphylococcus pasteurii* izole edilmiştir (Caplan vd., 2013; Trmcic vd., 2015). Bu mikroorganizmalar içinde hücre dışına ekzopolisakarit salgılayan *Leuconostoc* türlerinin sütte sünme (ropy) kusuruna ve bu nedenle ekonomik kayba neden olduğu bildirilmiştir (Trmcic vd., 2015). Sünme kusuruna neden olan bakterilerin araştırıldığı bir çalışmada, laktik asit bakterileri içinde sadece *Leuconostoc lactis* ve *Lactococcus lactis*'in 6°C'de gelişme gösterdiği belirlenmiş, bu nedenle soğukta depolanan sütteki bozulmadan da (sünme) bu iki bakterinin sorumlu olabilecekleri bildirilmiştir (Trmcic vd., 2015).

PSİKROTROFİK GRAM NEGATİF BAKTERİLER

Sütün sağımdan sonra soğutulması ve işleninceye kadar soğukta saklanması psikrotrofik bakterilerin baskın florayı oluşturmalarına neden olur. Sütün bozulmasına yol açan psikrotrofik Gram negatif bakteriler içinde en sık bulunan türler; *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* üyeleridir (Ribeiro vd., 2018; Fusco vd., 2020). Ayrıca *Brevundimonas*, *Flavobacterium* ve koliform üyeleri de daha az

rastlanan ve sütün bozulmasından sorumlu diğer psikrotrofik bakterilerdir (Trmcic vd., 2015; Koppenaal vd., 2017; Júnior vd., 2018). Bozulmaya neden olan bu bakteriler sütte, koku ve tat kusurlarına yol açabilen lipaz veya proteaz enzimlerini üretirler (Glantz vd., 2020; Fusco vd., 2020). Yapılan araştırmalarda süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Pseudomonas* izolatlarının sırasıyla %33 ve %52'sinin proteaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Caldera vd., 2016; Machado vd., 2017). *Pseudomonas* türleri içinde *P. fragi*, *P. gessardii*, *P. fluorescens*, *P. rhodesiae*, *P. brenneri*, *P. proteolytica* sütün bozulmasına sıklıkla yol açan türlerdir (Jonghe vd., 2011; Trmcic vd., 2015; Caldera vd., 2016).

Psikrotrofik bakteriler, özellikle *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türleri tarafından üretilen ısıya dayanıklı, proteolitik ve lipolitik enzimler pastörizasyon aşamasından sonra sütün bozulmasına neden olur (von Neubeck vd., 2015; Yuan vd., 2018; Yuan vd., 2019). Lezzet kusurlarının yanında sütteki en önemli bozulma proteolize bağlı olarak oluşan pıhtılaşmadır. Bu tip bozulma UHT sütlerde karşılaşılan önemli bir sorundur (Zhang vd., 2019).

Sütte yüksek lipo-protein lipaz (LPL) miktarının yüksek bakteri sayısı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Barbano vd., 2006). Lipo-protein lipaz, sığır sütündeki başlıca lipazdır ve sütte teknolojik açıdan en önemli enzim olarak kabul edilmektedir (O'Mahony vd., 1990). Lipolitik aktivite, serbest yağ asitleri (FFA) ve diğer yağ asitleri ile ilişkili olup, özellikle kısa zincirli yağ asitlerinin süt tadında bozulmaya neden olduğu belirlenmiştir (Glantz vd., 2020).

Sütte sünme kusurunun nedeni olan psikrotrofik koliform bakterilerin ayırımında minimum gelişme sıcaklığının önemli olduğu bildirilmiştir. Sütte bozulmaya yol açan *Hafnia paralvei*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Rahnella inusitata*, *Raoultella* ve *Klebsiella* gibi koliformlar arasında özellikle *Rahnella inusitata*'nın 6°C'de iyi gelişme gösterdiği ve sütteki sünme kusurundan sorumlu olduğu belirtilmiştir (Trmcic vd., 2015; Hahne vd., 2018).

GRAM POZİTİF SPORLU BAKTERİLER

Sütün pastörizasyon sonrası proteolitik ve lipolitik enzimlerle bozulmasına hem spor oluşturan hem de spor oluşturmeyen Gram pozitif bakteriler neden olabilir. Psikrotolerant-termodurik (soğuga toleranslı-yüksek sıcaklığa dayanıklı) sporlu bakteriler sütün sağımını izleyen soğutma aşamasında çoğalır ve spor formunda daha sonraki ısıl işlemde canlı kalarak sütün bozulmasına yol açar (De Jonghe vd., 2010; Doyle vd., 2015; Ribeiro vd., 2020). Bu tür bir bozulmaya, spor oluşturan bakterilerden *Paenibacillus* cinsi ve *Bacillus weihenstephanensis* gibi soğuga toleranslı bazı *Bacillus* türleri neden olur (Ranieri vd., 2012; Trmcic vd., 2015). Bu organizmalardan kaynaklanan bozulma, sütün 6°C civarında depolanması durumunda tipik olarak 17 ila 21 gün raf ömründe meydana gelir (Trmcic vd., 2015; André vd., 2017). *Bacillus* ve *Paenibacillus* sütün bozulmasına yol açan en önemli sporlu bakterilerdir (Ranieri vd., 2012; Trmcic vd., 2015; Olajide vd., 2020). *Bacillus* türleri içinde sütün bozulmasına en sık yol açan türün *B. cereus* olduğu bildirilmiştir (De Jonghe vd., 2010; Porcellato vd., 2020). Ayrıca, *Bacillus cereus* ve *P. polymyxa* kuvvetli proteolitik ve lesitinaz aktivitesi ile hem proteinlerin parçalanmasından hem de sütte yağ zerreciklerinin kümelenmesinden kaynaklanan acı krema kusurlarından sorumludur (De Jonghe vd., 2010; Murphy vd., 2016). *Bacillus pumilus* sadece kuvvetli lipolitik aktivite gösterirken, *B. amyloliquefaciens* ve *B. subtilis*'in hem kuvvetli lipolitik hem de proteolitik aktiviteye sahip olmaları nedeniyle sütün bozulmasında önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (Coorevits vd., 2008; De Jonghe vd., 2010). Bu türlere ilave olarak *B. clausii* ve *B. licheniformis* türlerinin de sütte bozulmaya yol açtığı belirlenmiştir (De Jonghe vd., 2010; Miller vd., 2016). Yeni türlerin ve soyların sık sık yeniden sınıflandırılıp tanımlanması nedeniyle *Bacillus* türlerinin isimlendirilmesinde önemli değişiklikler olduğunu vurgulayan araştırmacılar, *Bacillaceae* familyasına ait bir izolata tür adı atamanın zor olduğunu belirtmişler ve çözüm olarak farklı genotiplere güvenilir sınıflandırma sağlayan *rpoB* (RNA polimeraz beta subunit) geninin de kullanılmasını önermişlerdir (Trmcic vd., 2015).

SONUÇ

Dünya genelinde çiğ süt üretimi 2018'de 842 milyon ton, Türkiye'deki süt üretimi ise 22 milyon tondur (İDF, 2019; FAO, 2019). Sütün yaklaşık %30'luk kısmı bozularak atılmaktadır. Diğer yandan hem çiğ hem de pastörize sütün ve süt ürünlerinin çok sayıda gıda kaynaklı hastalığa yol açtığı bilinmektedir (Guh vd., 2010; Weiler vd., 2011; Jones vd., 2019). Süt sağımının hijyenik koşullarda yapılmaması, barınakların temiz ve bakımlı olmaması, ekipmanların temizlik ve dezenfeksiyonuna dikkat edilmemesi, suyun temiz olmaması, süt hayvanlarında mastitis (meme iltihabı) gibi hastalıkların varlığı ve işletmenin sanitasyon kurallarına uygun üretim yapmaması gibi nedenler sütün bozulma yapan ve patojen bakterilerle bulaşmasına neden olur. Süte bulaşan mikroorganizmaların sayım ve tanımlanmasında kültüre bağlı ve kültürden bağımsız olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Çiğ süt mikrobiyotasının mikrobiyolojik analizlerinin çoğu kültüre bağlı yöntemlere dayanmaktadır (Kırdar 2017; Redrigues vd., 2017). Süt endüstrisindeki standart mikrobiyel testler, toplam mezofilik bakteri sayımına ve mikrobiyel bulaşmanın göstergesi olarak enterobakterilerin sayısını belirlemeye odaklanmıştır (Sadiq vd., 2016; Fusco vd., 2020). Mezofilik bakteri sayısının 200 bin KOB/mL'den fazla olması bulaşmanın yüksek, 200 bin KOB/mL'den az olması ise sütün tüketime uygun olduğunu göstermektedir (Rodrigues vd., 2017). Bununla birlikte, bilim insanları proteolitik ve lipolitik *Pseudomonas* veya *Acinetobacter* ve psikrotrofik *Bacillus*'un sütün bozulmasında daha önemli bir rol oynayabileceğini, bu bakterilerin sayım ve tayininde kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), akış sitometrisi, döngü aracı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi kültürden bağımsız yöntemlerin kullanılmasının daha avantajlı olabileceğini bildirmişlerdir (Trmcic vd., 2015; Agrimonti vd., 2019; Fusco vd., 2020). Beslenmede çok önemli bir yere sahip olan sütte mikroorganizma bulaşma ve gelişmesinin önlenmesi ile süt ürünlerinde de istenilen kalite ve güvenliğin sağlanması mümkün olabilecektir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemektedir.

YAZAR KATKILARI

Cem Sezai BAŞAR, araştırma fikri ve hipotezini oluşturulması, yürütülmesi, kaynak taranması, çalışmanın yazılmasına katkı sağlamıştır. Zeynep Dilek Heperkan, araştırma yönteminin oluşturulması, denetlenmesi, kaynak taranması, eleştirel inceleme, yazım ve dil yönüyle düzenlenmesine katkı sağlamıştır

KAYNAKLAR

Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from-omics studies. *Mol. Biosyst.*, 12, 2359–2372. <https://doi.org/10.1039/C6MB00217J>

Agrimonti, C., Bottari, B., Sardaro, M. L. S., & Marmiroli, N. (2019). Application of real-time PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3), 423–442. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1375893>

Andre, S., Vallaeys, T., Planchon, S. (2017). Spore-forming bacteria responsible for food spoilage. *Res Microbiol*, 168(4), 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.003>

Anonymous (2019): FAO, Overview of global dairy market developments in 2018. Retrieved from <http://www.fao.org/3/ca3879en/ca3879en.pdf>

Anonymus. (2019): IFD Turkey Dairy Sector. Retrieved from <https://idfws2019.com/en/turkey-dairy-sector>.

Barbano, D.Mistanbulis., Ma, Y., Santos, M.V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life *J Dairy Sci* 2006 Mar;89 Suppl 1:E15-9. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72360-8.

Boor, K. J., Wiedmann, M., Murphy, S., Alcaine, S. (2017). A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. *J Dairy Sci*, 100(12), 9933–9951. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12969>

Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity

quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiol* 54 (2016) 142-153.

Caplan, Z., C. Melilli, and D. M. Barbano. (2013). Gravity separation of fat, somatic cells, and bacteria in raw and pasteurized milks. *J. Dairy Sci.* 96:2011–2019.

De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int J Food Microbiol*, 136(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.007>

Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., & Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Sys. App. Microbiol.*, 31(2), 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.03.002>

Dortey, M. D., Aboagye, G., Tuah, B. (2020). Effect of storage methods and duration of storage on the bacteriological quality of processed liquid milk post-opening. *Sci Afr*, 10, e00555. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00555>

Dousset, X., Jaffrès, E., Zagorec, M. (2016). Spoilage: Bacterial Spoilage. *Enc of Food and Health*, 106–112. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00649-8>

Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Cotter, P. D. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *Int J Food Microbio*, 197, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>

Fusco, V., Reşfi, D., Fanelli, F., Logrieco, AF., Cho, GS., Kabisch, J., Böhnlein, C., Franz, CMAP. (2020) Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 19(4):2013-2049. doi: 10.1111/1541-4337.12568.

Glantz, M., Rosenlöw, M., Lindmark-Månsson, H., Buhelt Johansen, L., Hartmann, J., Höjer, A.,

- Paulsson, M. (2020). Impact of protease and lipase activities on quality of Swedish raw milk. *Int. Dairy J.*, 107, 104724. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104724>
- Golan, E., Buzby, J.C. (2015). Innovating to meet the challenge of FOOD WASTE *Food Technol.*, 69: 21-25
- Guh, A., Phan, Q., Nelson, R., Purviance, K., Milardo, E., Kinney, S., ... Cartter, M. (2010). Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with raw milk, Connecticut, 2008. *Clinical Infectious Disease*, 51(12), 1411–1417. <https://doi.org/10.1086/657304>
- Hahne J, Isele D, Berning J, Lipski A. (2019). The contribution of fast growing, psychrotrophic microorganisms on biodiversity of refrigerated raw cow's milk with high bacterial counts and their food spoilage potential. *Food Microbiol.* doi: 0.1016/j.fm.2018.10.019.
- Holzappel, W. H., Todorov, S. D., Cogan, T. M. (2020). History of Dairy Bacteriology. *Ref Mod in Food Sci* 1–10. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.23031-x> <http://dx.doi.org/10.5772/55937>
- Jones, G., Lefèvre, S., Donguy, M. P., Nisavanh, A., Terpant, G., Fougère, E., Mariani-Kurkdjian, P. (2019). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26 paediatric haemolytic uraemic syndrome (HUS) cases associated with the consumption of soft raw cow's milk cheeses, France, March to May 2019. *Euro Surveillanc*, 24(22), 1900305. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900305>
- Jonghe, V., Coorevits, A., Van Hoorde, K., Messens, W., Van Landschoot, A., De Vos, P., Heyndrickx, M. (2011). Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 460-470.
- Júnior, JCR.,Oliveira, BMD., Silva, FD., Tamanini, R., Oliveira, BLMD., Beloti, V.(2018) The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Milk Sci.* an;101(1):75-83. doi: 10.3168/jds.2017-13069.
- Kirdar, SS. (2017): An overview of the Turkish dairy sector. *Ind J Dairy Sci*, 70, 249-255.
- Koppenaar, H., Groenendiik, F., van den Berge, M., Verkade, E., Verduin, K., Zomer, A.L., Duim, B., Wagenaar, J.A., Tijmsa, A.S.L., Spierenburg, M.A.H., Wierik, M.J.M. (2017). Outbreak of *Campylobacter fetus* infection after consumption of unpasteurized sheep's milk cheeses: how to trace the source? *Ned. Tijdschr Geneesk* ;161:D1704
- Lu, M., Wang, N. S. (2017). Spoilage of Milk and Dairy Products. *The Microbiol Qua of Food*, 151–178. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100502-6.00010-8>
- Machado, SG., Baglinière, F., Marchand, S., Coillie, EV., Vanetti MCD., Blok, JD., Heyndrickx, M. (2017). The Biodiversity of the Microbiota Producing Heat-Resistant Enzymes Responsible for Spoilage in Processed Bovine Milk and Dairy Products, *On Mikrobiyol*, Mar 1;8:302.
- Martin NH, Kent DJ, Evanowski RL, Zuber Hrobuchak TJ, Wiedmann M. (2019) Bacterial spore levels in bulk tank raw milk are influenced by environmental and cow hygiene factors. *J Dairy Sci.* 2019 Nov; 102 (11) :9689-9701. doi: 10.3168/jds.2019-16304. Epub 2019 Aug 22.
- Martin, N. H., N. R. Carey, S. C. Murphy, M. Wiedmann, and K. J. Boor. (2012). A decade of improvement: New York State fluid milk quality. *J. Dairy Sci.* 95:7384–7390. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5767>.
- Martins, ML.,Pinto, UM.,Riedel, K.,Vanetti, MCD. (2018). Quorum Sensing and Spoilage Potential of Psychrotrophic *Enterobacteriaceae* Isolated from Milk. *Biomed Res Int.* 22;2018:2723157. doi: 10.1155/2018/2723157
- Miller RA., Beno SM, Kent DJ.,Carroll LM. Martin NH. Boor KJ. Kovac J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; 66: 4744-4753
- Murphy SC. Martin N. Barbano D. Wiedmann M. (2016). Influence of raw milk quality on processed

- dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *J. Dairy Sci.*; 99 : 10128-10149 Doi:10.3168/jds.2016-11172
- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A. M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O., & Salkinoja-Salonen, M. (2007). Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet. Microbiol.* 124(3-4), 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.015>
- Olajide A.M., LaPointe G. (2020). Detection of spore forming *Paenibacillus macerans* in raw milk. *J Microbiol Methods.* 2020. 177:106048. doi: 10.1016/j.mimet.2020.106048.
- O'Mahony, M., Mitchell, E., Gilbert, R., Hutchinson, D., Begg, N., Rodhouse, J., Morris, J., (1990). An outbreak of foodborne botulism associated with contaminated hazelnut yoghurt. *Epidemiol. Infect.* 104 (03), 389–395.
- Porcellato, D., Skeie, SB., Mellegård, H., Monshaugen, M., Göransson Aanrud, S., Lindstedt, BA., Aspholm, M. (2021). Characterization of *Bacillus cereus* sensu lato isolates from milk for consumption; phylogenetic identity, potential for spoilage and disease. *J Food Microbiol*, 93, 103604. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103604>
- Ranieri, ML., Ivy, RA., Mitchell, WR., Call, E., Masiello, SN., Wiedmann, M., Boor, KJ., (2012). Real-time PCR detection of *Paenibacillus spp.* in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (16), 5855–5863.
- Ribeiro Junior JC, de Oliveira AM, Silva FG, Tamanini R, de Oliveira ALM, Beloti V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J Dairy Sci.* 2018; 101(1):75-83. doi: 10.3168/jds.2017-13069.
- Ribeiro-Júnior, JC., Tamanini, R., Alfieri, B., Beloti, V. (2020). Effect of milk bacto-fugation on the counts and diversity of thermophilic bacteria. *J Sut Sci.* 103(10):8782-8790. doi: 10.3168/jds.2020-18591.
- Rodrigues, MX., Lima, SF., Canniatti-Brazaca, SG., Bicalho, RC. (2017). The microbiome of bulk tank milk: Characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *J Dairy Sci*, 100(4), 2536–2552. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11540>
- Ryser, ET. (2016). Pasteurization of Liquid Milk Products: Principles, Public Health Aspectsç R *Mod Food Sci*, 310–315. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21367-x>
- Sadiq, FA., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., Yuan, L., Pai, Z., He, GO. (2016). The heat resistance and spoilage potential of aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders *Int J Food Microbiol.* 2016. 5;238:193-201. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.009.
- Techer, C., Jan, S., Thierry, A., Maillard, MB., Grosset, N., Galet, O., Breton, V., Gautier, M., Baron, F. (2020). Identification of the bacteria and their metabolic activities associated with the microbial spoilage of custard cream desserts. *Food Microbiol*; 86:103317. doi: 10.1016/j.fm.2019.103317.
- Trmcic, A., Martin, NH., Boor, KJ., Wiedmann, M. (2015). A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage. *J Dairy Sci*, 98(8), 5806–5817. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9490>
- Von Neubeck, M., Baur, C., Krewinkel, M., Stoeckel, M., Kranz, B., Stressler, T., Wenning, M. (2015). Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *Int J Food Microbiol*, 211, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.001>
- Weiler, N., Leotta, G. A., Zuarate, M. N., Manfredi, E., Alvarez, M. E., & Rivas, M. (2011). Foodborne outbreak associated with consumption of ultrapasteurized milk in the Republic of Paraguay. *Rev Argentina de Microbiol*, 43(1), 33–36. <https://doi.org/10.1590/s0325-75412011000100007>
- Wyder, MTF., Roth, EA., Jakob, E. (2019). Cheese yeasts, *Wiley Yeast* Maya, 36(3):129-141. doi: 10.1002/yea.3368.

Young, W., Hine, B. C., Wallace, O. A. M., Callaghan, M., Bibiloni, R. (2015). Transfer of intestinal bacterial components to mammary secretions in the cow. *PeerJ*, 3, Article e888. <https://doi.org/10.7717/peerj.888>.

Yuan L, Sadiq FA, Burmølle M, Wang NI, He G. (2019). Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review. *J Food Prot.* 82(7):1148-1159. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-19-032. PMID: 31225978.

Yuan, L., Sadık, F., Liu , TJ., Li, Y., Gu, JS., Yang, HY., Guo-Qing O. (2018). Spoilage potential of

psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes *Zhejiang Univ Sci B.* 19(8):630-642. doi: 10.1631/jzus. B1700352.

Zhang, C., Bijl, E., Svensson, B., Hettinga, K. (2019). The Extracellular Protease AprX from *Pseudomonas* and its Spoilage Potential for UHT Milk: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 18(4):834-852. doi: 10.1111/1541-4337.12452.

**ATTRIBUTES of TOTAL PHENOLIC CONTENT, ANTIOXIDANT CAPACITY
and *IN-VITRO* SIMULATED BIOACCESSIBILITY of ASTRINGENT,
NON-ASTRINGENT and WILD (ROOTSTOCK) PERSIMMONS**

Emine Aydın*

Duzce University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Duzce, Türkiye

Received / Geliş: 11.02.2021; Accepted / Kabul: 19.04.2021; Published online / Online baskı: 23.04.2021

Aydın, E. (2021). *Attributes of total phenolic content, antioxidant capacity and in-vitro simulated bioaccessibility of astringent, non-astringent and wild (rootstock) persimmons*. GIDA (2021) 46 (3) 669-680 doi: 10.15237/gida.GD21032

Aydın, E. (2021). Buruk, buruk olmayan ve yabani (anaç) hurmaların toplam fenolik bileşen, antioksidant kapasite ve in-vitro simule edilmiş biyoalınabilirlik özellikleri. GIDA (2021) 46 (3) 669-680 doi: 10.15237/gida.GD21032

ABSTRACT

Persimmon which is widely known as “Trabzon Hurması” and “Cennet Meyvesi” is a very popular fruit with bright orange color. In the presented study, extractable, non-extractable, total phenolic content (TPC), antioxidant capacity (AC) and bioaccessibility of Trabzon persimmons (astringent, non-astringent and wild persimmon) were determined. The results of this study indicated that all types of persimmons have great importance both on TPC, AC and bioaccessibility. Compared to astringent and non-astringent types, the wild persimmon type had the highest TPC. Another attractive result from this study, although the wild persimmons do not prefer for consumption, the results demonstrated that the bioaccessible phenolics of this type of persimmons were found to be 6.7 fold higher than the non-astringent types and 4.7 fold higher than the astringent types. Especially the wild type of persimmon is a good source of natural antioxidant and further studies should be carried out for wild type persimmon.

Keywords: Persimmon, total phenolic, antioxidant capacity, *in-vitro* bioaccessibility

**BURUK, BURUK OLMAYAN ve YABANİ (ANAÇ) HURMALARIN TOPLAM
FENOLİK BİLEŞEN, ANTIOKSİDANT KAPASİTE ve IN-VITRO SİMULE
EDİLMİŞ BİYOALINABİLİRLİK ÖZELLİKLERİ**

ÖZ

Parlak turuncu renge sahip olan hurma, Türkiye’de daha çok “Trabzon Hurması” ve “Cennet Meyvesi” olarak bilinmektedir. Bu çalışmada üç farklı çeşitte (buruk, buruk olmayan ve yabani) Trabzon hurmasının; ekstrakte, ekstrakte olmayan, toplam fenolik bileşen, antioksidan kapasite ve biyoalınabilirlikleri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, bütün hurma çeşitlerinde toplam fenolik bileşen, antioksidan kapasite ve biyoalınabilirlik büyük öneme sahiptir. Buruk ve buruk olmayan hurma çeşitleri ile karşılaştırıldığında, yabani hurma çeşidinin daha fazla toplam fenolik bileşen (864.85 mg GAE/100 g) içerdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bir başka ilgi çekici sonuçta ise her ne kadar tüketim için tercih edilmese de yabani hurma çeşidinin buruk olmayan hurma çeşidinden 6.7 kat, buruk hurma çeşidinden ise 4.7 kat daha yüksek biyoalınabilirliğe sahip

* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉ emineaydin@duzce.edu.tr

☎ (+90) 380 541 2294

☎ (+90) 380 541 2295

Emine Aydın; ORCID no: 0000-0001-9635-4791

olduğu tespit edilmiştir. Özellikle yabani hurma iyi bir doğal antioksidan kaynağıdır ve üzerinde daha fazla çalışma yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Hurma, toplam fenolik, antioksidan kapasite, in-vitro biyoalınabilirlik

INTRODUCTION

Persimmon is cultivated in a large part of China, Korea, Japan, Turkey, Brazil, and Italy (Butt et al., 2015), which belongs to Ebenaceae family and genus *Diospyros* (Martínez-Calvo et al., 2013). Commonly, above 400 species of persimmon are planted worldwide. Four of them; *Diospyros lotus*, *Diospyros kaki*, *Diospyros virginiana*, and *Diospyros oleifera* (Bibi et al., 2007) have important value (Zheng et al., 2006). The *D. lotus* L. is used as a rootstock for *D. kaki* L. (Messaoudi et al., 2009) and it knows as a wild type in Turkey (Günel, 2002). This persimmon is recognized as small size (Günel, 2002) and has a bluish-black color. The *D. lotus*, persimmon called as "Black Persimmon", "Black Fruit", "Plum Persimmon" (Baytop, 1999) and "Wild Trabzon Persimmon" (Günel, 2002). The *D. kaki* was made entry from the Black Sea region to Turkey and named the "Trabzon Persimmon-Trabzon Hurması". It is a commercially grown persimmon type. This type of persimmon widely spread out the many parts of Turkey and called as "Fruit of Paradise-Cennet Meyvesi" (Yeşiloğlu et al., 2017). The *D. kaki* types point out with its bright orange color and separated into astringent and non-astringent types. While the non-astringent types can eat up in the immature form, the astringent types solely can eat up in the mature form. When the astringent type fully turn to the mature form, just like a pudding form, has the delicious taste.

According to the numerous studies on plant species; the Trabzon persimmons being one of the best plant sources based on their phenolics and antioxidant capacities (Ayaz et al., 1997; Loizzo et al., 2009). From obtained data it was clearly detected that; the relationship between TPC and AC related to the powerful correlation between them (Grygorieva et al., 2018). Phenolic substances consisted in plant foods; while phenolic acids are divided into subgroups such as flavonoids, lignans and stilbenes, especially phenolic acids and flavonoids are important as antioxidants (Harşit, 2015).

Polyphenolic compounds, which are found in fruits and vegetables and constitute the major and most important part of secondary plant metabolites (Sakakibar et al., 2003). The ferulic acid, *p*-coumaric acid, gallic acid (Yaqub et al., 2016), catechin, epicatechin, catechin epigallo and condensed proanthocyanidins are the most commonly found phenolic compounds in persimmon (Giordani et al., 2011).

Suzuki et al. (2005), determined in their study, the total phenolic substance and catechin content of 3 astringent and 2 non-astringent types of persimmon. The gallic acid, catechin, epicatechin and epigallocatechin identified in the analyzed fruits. According to these results; researchers reported that the astringent types are rich in phenolic components, and consequently these fruits can be a good source of natural antioxidants.

The astringency is caused by the phenolic compounds included in the fruit (Yönel et al. 2008), especially tannins (Macheix et al., 1990; Mehmood et al., 2016). In this context, the persimmon fruit is defined by its high amount of tannins (tannic acid) which disappears when the fruit grows mature. The persimmon has also plenty of phenolic components other than tannins, and it has been demonstrated that these compounds may reduce the risk of chronic diseases (Gorinstein et al., 1994).

In recent studies, it has been determined that the persimmon fruits have the properties of lowering both cholesterol and high blood pressure, enhancing the immune, are good for digestive system diseases and have an important place in protection from common cancer diseases. In general, the persimmon fruits have a curative effect on eliminating weakness, anaemia, vitamin deficiency and gastrointestinal diseases. This fruits interrupt diarrhea, increases the appetite, prevents the stomach gastritis and heals the intestinal inflammation (Bölek, 2013).

Moreover, the persimmon fruit is a ideal source of vitamins such as vitamin A, vitamin E (Tuzcu and Yildirim, 2000) and vitamin C as well as the minerals such as Ca and K (Mowat, 1990). Due to all these excellent features, the fruit types such as persimmon are called the fruit of the future (Kaplankıran, 2011).

To the best of our knowledge, there has been no detailed research related to the comparison of three types of persimmon's extractable, non-extractable, TPCs, antioxidant capacities of astringent, non-astringent and wild persimmon species. Another target of this study is determination of *in-vitro* bioavailability of total phenolic and AC of samples. In this research

author planned to explore the properties of persimmons which obtained from the same location but in different harvest time.

MATERIAL AND METHODS

Materials

In this study, fresh and mature varieties of the astringent, non-astringent (*Diospyros kaki* L.) and wild (*Diospyros lotus* L.) persimmons were used. Photographs of the samples can be seen in Figure 1. The three different types of persimmons used were collected from a local garden in the center of Duzce, Turkey but in a different harvest time during the autumn in 2020. The raw materials were stored at +4°C until analyzed.



Figure 1. Photographs of persimmon samples

Methods

Chemicals

The Folin-Ciocalteu reagent, ethanol, methanol, ammonium acetate, sodium acetate, sodium carbonate, sodium chloride, and copper(II)chloride purchased from Merck (Germany). ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-ethylenbenzoline-6-sulfonic acid) radical cation, DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), bile extract, gallic acid, neocuproine, hydrochloric acid (37% w/v) and sulfuric acid (95-98%), pancreatin, pepsin,

potassium chloride, sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich (USA). All reagents were used for the analytical grade purity. The high-quality pure water was used to perform the analysis provided by the Milli-Q system (Millipore, USA).

Extraction for extractable and non-extractable phenolics

Extractable phenolic (EP) compounds of persimmon samples were determined to the method enhanced by Vitali et al. (2009) with minor modifications. The following procedure has been followed; two grams (2.0 g) of

persimmon sample was mixed with 20 mL of HCl conc./methanol/water (1:80:10, v/v/v) and shaken with laboratory rotary shaker at 250 rpm for 2 h at 20°C. At the end of the period, the mixture was centrifuged at 4°C for 10 min at 3500 rpm in a centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5430R, USA). The supernatants were separated and kept at -20°C (in dark condition) until experiments carried out.

To insulate the non-extractable phenolics (NEP), the residues which were obtained from the EPs were used. The residues combined with the 20 mL mixture of methanol/H₂SO₄conc. (10:1) and held in a water bath (at 85°C) for 20 h. At the end of the time, the mixtures cooled at room temperature and centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C (Eppendorf Centrifuge 5430R, USA). The supernatants of EP and NEP were kept in dark condition at -20°C until the analyses carried out.

Determination of total phenolic content

Total phenolic content was determined using a modified version of the Folin-Ciocalteu colorimetric procedure according to Xu et al. (2009). The diluted persimmon extracts (0.5 mL) were mixed with 2.5 mL deionized water and 0.5 mL of 1.0 M Folin-Ciocalteu reagent and the mixture vortexed at room temperature for 10 min. 1.5 mL sodium carbonate (7.5%) was added to the mixture and blended gently for 30 min at room temperature. At the end of the time, the absorbance was measured at 750 nm with Shimadzu UV-VIS spectrophotometer. The absorbance was compared to a standard curve of gallic acid (GA). The standard curve was (0-500 mg/L) plotted using gallic acid. TPC content was calculated the sum of EPs and NEPs. The results were expressed as the mg of GAE/100g dw.

Determination of bioaccessible phenolics

The bioaccessible phenolics were determined via simulated digestion system. In order to achieve this, the *in-vitro* digestion enzymatic extraction method was used that adopted from Vitali et al. (2009) with minor modifications. To provide the digestive system, the conditions in the human gastric and gastrointestinal tract was created in

this assay. According to this method, for simulating the gastric digestion, 1.0 g of persimmon sample was mixed with 10 mL distilled water and 0.5 mL of pepsin solution (20 g/L in 0.1 mol/L HCl) was added and incubated at 37°C in a shaking water bath for 1 h. After then, pH was adjusted to 7.2 and thus simulation of gastric digestion was stopped. Additionally, the intestinal-simulated digestion was performed with the addition of 2.5 mL of bile/pancreatin solution (2.0 g/L of pancreatin and 12 g/L of bile salt in 0.1 mol/L NaHCO₃) and 2.5 mL of NaCl/KCl (120 mmol/L NaCl and 5 mmol/L KCl) were added the samples and incubated in shaking water bath at 37°C for 2.5 h. After incubation, the persimmon samples were centrifuged at 3500 rpm/10 min and the supernatant was used for determination of bioaccessible phenolics which were stored -18°C until the analyses carried out. Bioaccessible phenolics were determined using Folin-Ciocalteu spectrophotometric method and expressed as gallic acid equivalents (mg of GAE/100g dw). Bioaccessibility was also estimated as the percentage of TPC. The bioaccessibility of antioxidants and phenolics (%) was estimated according to Anson et al. (2009).

Analysis of antioxidant capacity

ABTS⁺ assay

The ABTS⁺ (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) radical cation assay was analysed described by Apak et al. (2007). To generate the ABTS⁺ solution, the 7mM ABTS⁺ and 2.45 mM potassium persulfate was mixed and incubated at room conditions for 12-16 h in the dark. The ABTS⁺ solution was diluted with ethanol (98%) at a range of 1:10 to dilute the blue-green color. Four mL ethanol and 1.0 mL ABTS⁺ solution was mixed and stored in the dark for 6 min. At the end of the period the absorbance was measured at 734 nm (A_{blank}) by using Shimadzu UV-VIS spectrophotometer. On the other hand, the x mL extract of persimmon, (4- x) mL ethanol and 1 mL ABTS⁺ solution was mixed and kept in the dark for 6 min. At the end of the time, the absorbance was read (A_{sample}). The standard curve was plotted with using different concentrations (10-150 μ L) of Trolox. Results of AC were utilized with the calibration curve and

estimated in $\mu\text{mol Trolox/g}$ sample. The ABTS^{•+} radical scavenging activity was calculated with the following equality:

$$ABTS^{•+} \% = (A_{\text{blank}} - A_{\text{Sample}}) / (A_{\text{Blank}}) \times 100$$

CUPRAC assay

CUPRAC estimation was carried out according to the method outlined by Apak et al. (2007). In order of 1.0 mL 1×10^{-2} M CuCl_2^+ , 1.0 mL 7.5×10^{-3} M neocuproine, 1.0 mL 1M NH_4Ac buffer solution and x mL extract of persimmon and $(4-x)$ mL of diluted water were added and mixed. The mixture was let to stand at room temperature for 30 min. The final absorbance measured at 450 nm (Shimadzu UV-VIS spectrophotometer). The phenolic antioxidants were estimated as Trolox Equivalents Antioxidant Capacity (TEAC) in this method.

DPPH• assay

Estimation of DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was conducted according to Brand-Williams et al. (1995). Briefly, the DPPH• solution was mixed with the standard Trolox solution that prepared at 10, 25, 50, 75 and 100 μL concentrations (the total volume=4.0 mL). The mixture was left in the dark for 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min to determine the maximum and the unchanging absorbance. The absorbance was measured at 515 nm. The results of the assay were calculated in $\mu\text{mol Trolox/g}$ sample.

FRAP assay

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) was conducted according to the method of Benzie and Strain (1996). To prepare the FRAP reagent; 25 mL of 0.3 mol/L acetate buffer (pH 3.6), 2.5 mL of 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ and 2.5 mL 10 mmol/L TPTZ solution in 40 mmol/L HCl was mixed cautiously. This solution kept at 37°C in a water bath. To analyse, 100 μL extracted persimmon samples and 300 μL diluted water was mixed with 3 mL freshly prepared FRAP reagent and incubated at 37°C for 40 min. At the end of the time, absorbance was measured at 595 nm. The standard calibration curve was prepared between 10 to 100 $\mu\text{mol/L}$. The results of FRAP assay were expressed as in $\mu\text{mol Trolox/g}$ sample.

Statistical evaluation

Data obtained from persimmon analyzes were evaluated statistically by using variance analysis with JMP IN 7.0.0 (Statistical Discovery from SAS 2005. Institute Inc., Chicago, USA). The LSD test (Least Significant Differences) was used to determine the statistical difference between the mean values obtained.

RESULTS AND DISCUSSION

Extractable, non-extractable and total phenolic contents of persimmon samples

The TPC of persimmon samples which is the sum of the phenolic content of EPs and NEPs are presented in Figure 2. According to Figure 2, statistically ($P < 0.05$) significant differences in EPs, NEPs and TPC among the different types were recorded. Sample which is the wild type had the highest TPC (864.85 mg GAE/100g) while the lowest content (220.85 mg GAE/100g) was recorded in the non-astringent type. On the other hand, the TPC of the astringent type was found to be 336.28 mg GAE/100g. Karhan (2003) reported that the level of the TPCs of Fuyu (39.6-84.70 mg/kg) which is a non-astringent persimmon type was lower than Hachia (132.05-3745.40 mg/kg) which is an astringent persimmon type. In another study TPC of *D. lotus* (wild persimmon) fruit extract was found to be 130.3 mg/100g dw (Murathan, 2020). This result was considerably lower than in the present study. In a previous study carried out by the Kayacan (2020), it was found that the TPC of fresh persimmon was 265.1 mg GAE/100g. On the other hand, the TPC of persimmon was found to be 364.88 mg GAE/100g by Senica et al (2016). Their results were similar to the present study.

The EPs and NEPs compounds were found to be from 67.81 to 101.22 mg GAE/100g and from 137.29 to 766.62 mg GAE/100g, respectively (Figure 2). There were significant ($P < 0.05$) differences observed between EPs and NEPs compounds. According to the data obtained from a study published by Imeh and Khokhar (2002), it was reported that these differences could be related to the different varieties, genomics and harvest season of the samples. In this context, the samples of this study were harvested from late

September to early December. Moreover, samples were different variations in this present study. On the other hand, all these parameters can effect the

synthesis and accumulation of phenolic compounds in some parts of the plant (Imeh and Khokhar, 2002).

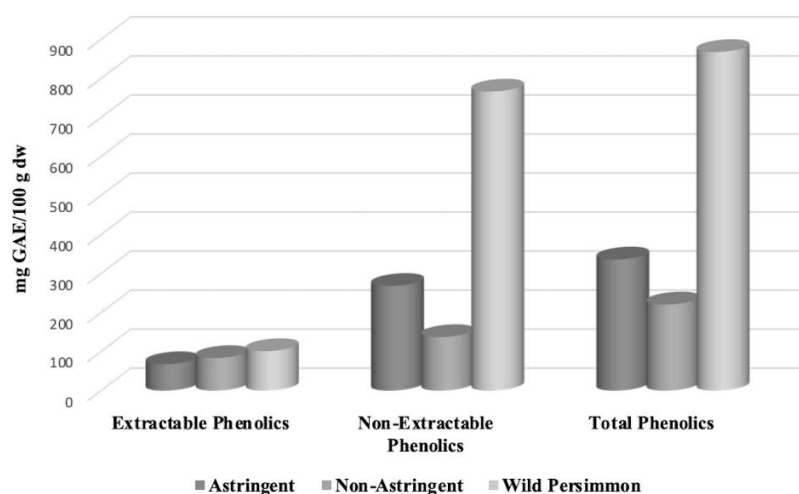


Figure 2. Extractable, non-extractable and total phenolic content of persimmon samples

Bioaccessible phenolics and phenolic bioaccessibility (%) of persimmon samples

Bioaccessibility (%) of phenolic content means that the amount of the phenolic contents which passes through the cell membrane in the intestine. Original phenolic content of food samples is depended to the availability of phenolics within these cells (Gunathilake et al., 2018). In this sense, as reported in the study by Sahan et al. (2017); along with the gastrointestinal digestion, antioxidants may interact with other food components, metabolized or be degraded. Therefore, the evaluation of bioaccessibility is important for a preferable knowledge of the usefulness associated with the consumption of persimmon types.

The contents of bioaccessible phenolics and phenolic bioaccessibility (%) of persimmon

samples are presented in Table 1. Statistically ($P < 0.05$) significant differences were recorded among the samples. The concentration of bioaccessible phenolics of persimmon samples ranged from 97.23 to 650.83 mg GAE/100g. Although the consumption of non-astringent types of persimmon is preferred by the people, the astringent types have approximately 1.5 fold higher bioaccessible phenolics than the non-astringent types. Another attractive result from this study, although the wild persimmons do not prefer for consumption, the results demonstrated that the bioaccessible phenolics of this type of persimmons were found to be 6.7 fold higher than the non-astringent types and 4.7 fold higher than the astringent types.

Table 1. Bioaccessible phenolics and phenolic bioaccessibility of persimmon samples*

Samples		Bioaccessible Phenolics (mg GAE/100g)	Phenolic Bioaccessibility (%)
<i>Diospyros kaki</i> L.	Astringent	137.93±1.21 ^b	40.99±3.03 ^b
	Non-Astringent	97.23±9.96 ^c	44.29±6.31 ^b
<i>Diospyros lotus</i> L.	Wild Persimmon	650.83±1.32 ^a	75.15±1.62 ^a

*Mean values ± standard deviation with different superscript in the same row are significantly different ($P < 0.05$). GAE=Gallic Acid Equivalents

The phenolic bioaccessibility (%) of persimmon samples ranged between from 40.99 to 75.15 %. Likewise, the wild persimmons had a higher phenolic bioaccessibility (%) than the other types of persimmon (Table 1).

Antioxidant capacity of persimmon samples
 ABTS⁺, CUPRAC, DPPH[•] and FRAP methods were used to determine the AC of persimmon

types. The results are presented in Figure 3. In the comparison of the levels of ABTS⁺, CUPRAC, DPPH[•] and FRAP antioxidant capacities among persimmon samples, significant ($P < 0.05$) differences were observed in both EPs and NEPs. It is clear that the NEPs were higher than the EPs according to all antioxidant assays.

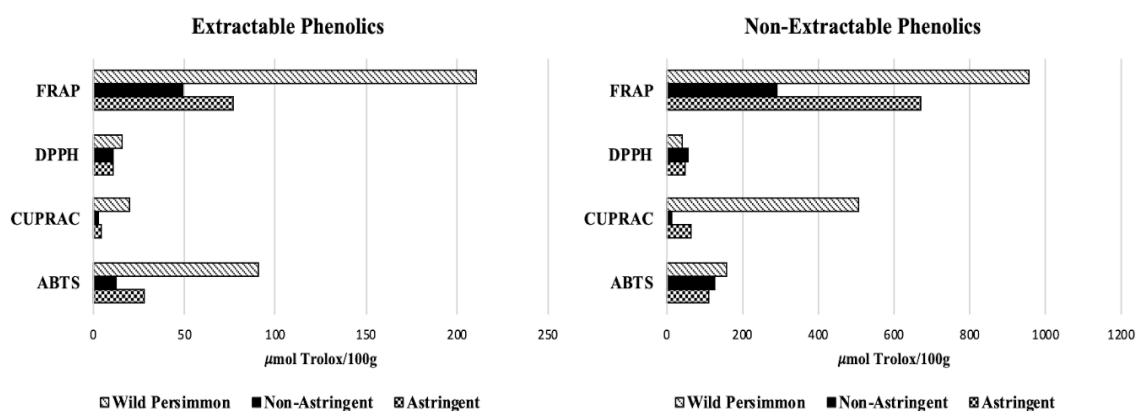


Figure 3. Antioxidant capacities of extractable and non-extractable phenolics of persimmon samples

After the discharged by intestinal microflora fermentation, the NEPs may escape from upper gastrointestinal digestion and are absorbed into the blood plasma. So this bound phenolics that is non-extractable form may have subscribed to more health benefits (Arranz et al., 2009; Pérez-Jiménez and Torres, 2011). In a previous study carried out by Sun et al. (2002), it was reported that almost 24% of phenolic compounds in fruit still consisted in non-extractable form.

The ABTS⁺ values were determined between from 109.90 to 158.25 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ (NEPs) and from 12.86 to 90.64 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ (EPs) in persimmon samples (Figure 3). The AC of non-astringent type persimmon (Fuyu) was found to be 18.17 $\mu\text{mol TEA}$ by Kim et al. (2020). In the study published by Grygorieva et al. (2018), the AC of *D. kaki* cultivars found to be 47.86-3716.28 $\mu\text{mol}/100\text{g}$. In the same study, the authors reported that the AC (ABTS⁺) of *D. virginiana* genotypes (American persimmon) ranged from 51.68 to 100.87 $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$. Oksuz et al. (2015) investigate the AC of persimmon by

ABTS⁺ methods and the result was found to be 364.85 mg TEAC/100g. In another study, Pu et al. (2013) investigated the AC of *D. kaki* cultivars by ABTS⁺ method from 47.86 to 3716.28 $\mu\text{mol}/100\text{g}$.

In the non-extractable phenolics of CUPRAC values between 13.14 and 506.28 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ were determined, whereas in extractable phenolics were ranged between from 2.56 to 19.67 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ (Figure 3). Kayacan et al. (2020) investigated the AC of fresh persimmon sample by CUPRAC method and the result found to be 635.2 mg TE/100g dm. In their study, Kim et al. (2020) determined the AC of non-astringent type (Fuyu) persimmon was 29.12 $\mu\text{mol TEA}$.

As can be observed in Figure 3, the AC of the DPPH[•] method exhibited lower than the other methods (ABTS⁺, CUPRAC and DPPH[•]). According to the results, the AC of non-extractable phenolics ranged from 39.77 to 56.30 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ likewise in extractable

phenolics the values changed between 10.44-16.07 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$. Pu et al. (2013) evaluated the AC of *D. kaki* cultivars by DPPH \cdot method and reported that the results ranged from 190.83 to 2223.11 $\mu\text{mol}/100\text{ g}$. Kayacan et al. (2020) investigated the AC of fresh persimmon sample by DPPH \cdot method and the result found to be 299.7 mg TE/100 g dm. Similar with this results, Oksuz et al. (2015) reported that AC of persimmon that determined by the DPPH method was 217.60 mg TEAC/100g. In another study, the AC of the persimmon sample was found to be 3.24 mg Trolox eq/g dm (Heras et al. 2017).

In this study, results showed that the AC of the FRAP method exhibited higher than the other methods (ABTS $^{+\cdot}$, CUPRAC and DPPH \cdot) (Figure 3). The non-extractable phenolics of FRAP values were dedicated within the range of 289.84-954.88 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$, whereas in extractable phenolics were 48.97-210.49 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{g}$ in this study. Likewise, Grygorieva et al. (2018) obtained the AC of *D. virginiana* between 45.06 to 109.30 $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$. In another study, Pu et al. (2013) investigated the antioxidant activity of *D. kaki* cultivars by FRAP method found to be from 90.10 to 957.74 $\mu\text{mol}/100\text{g}$.

It was found that persimmon types had the highest AC. In the present study, the best AC was detected in the sample of wild persimmon. In the comparison of two types, the AC of astringent type has been found higher than non-astringent type. In the literature, the persimmon has different concentrations of TPC. This may be due to differences in harvest time, climatic conditions, and methods of analysis.

Bioaccessible antioxidants and bioaccessibility (%) of antioxidant capacity of persimmon samples

Table 2 also showed the bioaccessible antioxidants of persimmon samples. According to the Table 2, the bioaccessible antioxidants of ABTS $^{+\cdot}$, CUPRAC, DPPH \cdot and FRAP methods represented 65.36-112.95 $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$, 40.02-550.24 $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$, 19.18-232.56 $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$ and 17.69-542.69 $\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$ of the initial contents of the samples (Table 2). As can be observed, the bioaccessible antioxidants of wild persimmon were higher than the astringent and non-astringent types. In the study carried out by Kayacan et al. (2020), the bioaccessible TPC and CUPRAC of fresh persimmon was found to be 265.1 mg GAE/100g dm and 635.19 mg TE/100g dm, respectively.

Table 2. Bioaccessible antioxidants of persimmon samples*

Sample		Bioaccessible Antioxidants ($\mu\text{mol Trolox}/\text{g}$)			
		ABTS $^{+\cdot}$	CUPRAC	DPPH \cdot	FRAP
<i>Diospyros kaki</i> L.	Astringent	78.02 \pm 2.95 ^b	47.12 \pm 3.61 ^b	22.04 \pm 4.85 ^b	47.33 \pm 2.57 ^b
	Non-Astringent	65.36 \pm 3.62 ^c	40.02 \pm 1.84 ^c	19.18 \pm 3.75 ^c	17.69 \pm 0.34 ^c
<i>Diospyros lotus</i> L.	Wild Persimmon	112.95 \pm 1.48 ^a	550.24 \pm 1.30 ^a	232.56 \pm 3.08 ^a	542.69 \pm 1.84 ^a

* Mean values \pm standard deviation with different superscript in the same row are significantly different ($P < 0.05$)

ABTS $^{+\cdot}$, CUPRAC, DPPH \cdot and FRAP methods were used to determine the bioaccessibility (%) of antioxidant capacity of persimmon types and the results are presented in Figure 4.

As can be observed by the results, the bioaccessibility of the astringent and non-astringent persimmon was found to be 56.83 and 67.50 % in ABTS method, respectively. When

viewed from the aspect of wild type of persimmon, the bioaccessibility results were found to be 84.14% (CUPRAC) and 86.05% (FRAP). This results showed greater than average 50% antioxidant bioaccessibility. Heras et al. (2017) announced that bioaccessibility (%) of the total AC of persimmon samples was found to be 33%.

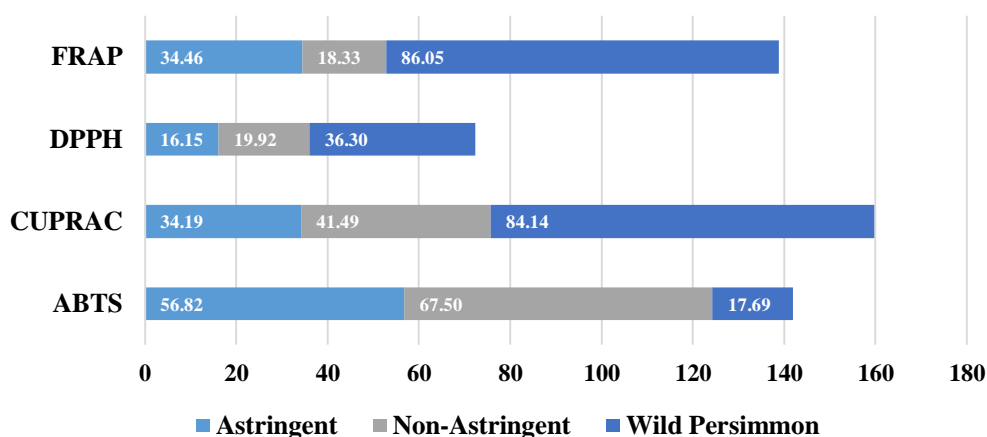


Figure 4. Bioaccessibility (%) of antioxidant capacity for persimmon samples

CONCLUSION

In this study, three different types of (astringent, non-astringent and wild) persimmons were applied to determine the effect on antioxidant capacities, TPCs and bioaccessibilities. In this sense, this study was the first evaluation to show the differences between astringent, non-astringent and wild (rootstock) persimmon related to the antioxidant capacities, TPCs and bioaccessibilities. Obtained results demonstrated that all persimmon extracts have a high antioxidant capacity, that associated with the TPC. According to these considerations, the types of persimmons have a great importance both on TPC, antioxidant capacity and bioaccessibility. The results showed that especially the wild type of persimmon is a good source of natural antioxidant. Additionally, it can be concluded from the results that, further studies should be carried out for wild type persimmon.

CONFLICT OF INTEREST

The author declare no conflict of interest.

REFERENCES

Anson, N.M., Selinheimo, E., Havenaar R., Aura, A.M., Mattila, I., Lehtinen, P., Bast, A., Poutanen, K., Haenen, G.R.M.M. (2009). Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 57(14): 6148-6155, doi: 10.1021/jf900492h.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, E.S., Bektaşoğlu, B.K., Berker, I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds and the CUPRAC Assay. *Molecule*, 12:1496-1547, doi:10.3390/12071496.

Arranz, S., Saura Calixto, F., Shaha, S., Kroon, P.A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *J Agr Food Chem*, 57: 7298-7303, doi: 10.1021/jf9016652.

Ayaz, F.A., Kadioglu, A., Reunanen, M. (1997). Changes in phenolic acid contents of *Diospyros lotus* L. during fruit development. *J Agric Food Chem*, 45(7):2539-2541, doi:10.1021/jf960741c.

Baytop, T. (1999). *Türkçe Bitki Adları Sözlüğü*. Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu, Türk Dil Kurumu Yayınları, No 578, Ankara, 1999, 156 s.

Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239:70-76, doi:10.1006/abio19960292.

Bibi, N., Khattak, A.B., Mehmood, Z. (2007). Quality improvement and shelf life extension of persimmon fruit *Diospyros kaki*. *J Food Eng*, 79:1359-63, doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.04.016.

- Bölek, S. (2013). Farklı yöntemlerle kurutulmuş trabzon hurmalarının çeşitli kalite karakteristiklerinin kıyaslanması. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Manisa, Türkiye, 120 s.
- Brand-Williams, W., Cavalier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant capacity. *Food Sci Technol*, 28(1):25-30, doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- 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. *EXCLI Journal*, 14:542-561, doi:10.17179/excli2015-159.
- Giordani, E., Doucette, S., Nin, S., Del Bubba, M. (2011). Selected primary and secondary metabolites in fresh persimmon (*Diospyros Kaki* Thunb.): A review of analytical methods and current knowledge of fruit composition and health benefits. *Food Res Int*, 44:1752-1767. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.036.
- Gorinstein, S., Zemser, M., Weisz, M., Halevy, S., Deutsch, J., Tilus, K., Feintuch, D., Guerra, N., Fishman, M., Bartnikowska, E. (1994). Fluorometric analyses of phenolics in persimmons. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58:1087-1092. doi:10.1271/bbb.58.1087.
- Grygorieva, O., Kucharska, A.Z., Piórecki, N., Klymenko, S., Vergun, O., Brindza, J. (2018). Antioxidant activities and phenolic compounds in fruits of various genotypes of American Persimmon (*Diospyros virginiana* L.). *Acta Sci Pol Technol Aliment*, 17(2):117-124, doi: 10.17306/J.AFS.2018.0544.
- Gunathilake, K.D.P.P., Ranaweera, K.K.D.S., Rupasinghe, H.P.V. (2018). Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food Chem*, 245:371-379, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.096.
- Günel N. (2002). Türkiye Doğal Bitki Örtüsünde Relik Bir Tür: *Diospyros Lotus* L. (Küçük meyveli Trabzon hurması). *ÖNERİ* 5(55):237-244.
- Harşıt, B. (2015). Doğu Karadeniz Bölgesi'nde halk arasında tıbbi amaçlı kullanılan bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Artvin, Türkiye, 66 s.
- Heras, R.M.-L., Pinazo, A., Heredia, A., Andrés, A. (2017). Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 214:478-485.
- Imeh, U., Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J Agr Food Chem*, 50(22):6301-6306.
- Karhan, M., Artık, N., Özdemir, F. (2003). Changes of major phenolic compounds, major carotenoids and L-Ascorbic acid composition determined by HPLC in persimmon (*Diospyros kaki* L.) during ripening. *GIDA* 28(4):349-353.
- Kayacan, S., Karasu, S., Akman, P.K., Goktas, H., Doymaz, I. (2020). Effect of different drying methods on total bioactive compounds, phenolic profile, in vitro bioaccessibility of phenolic and HMF formation of persimmon. *LWT-Food Sci Technol*, 118:108830.
- Kaplankıran, M. (2011). Subtropik Meyveler II (Ders Notları). Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Hatay (Yayımlanmamış).
- Kim, Y.M., Park, Y.S., Park, Y.K., Ham, K.S., Kang, S.G., Barach, D., Nemirovski, A., Gorinstein, S. (2020). Phytochemical analysis of two main varieties of persimmon and kiwifruit and their antioxidative and quenching capacities. *Eur Food Res Tech*, 246:1259-1268. doi: 10.1007/s00217-020-03486-z.
- Loizzo, M.R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U.W., Rashed, K., Menichini, F., Frega, N.G., Menichini, F. (2009). Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum Nutr*, 64(4):264-270, doi: 0.1007/s11130-009-0133-0.

- Martínez-Calvo, J., Naval, M., Zuriaga, E., Llácer, G., Badenes, M.L. (2013). Morphological characterization of the IVIA persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) germplasm collection by multivariate analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60:233-241, doi: 10.1007/s10722-012-9828-4.
- Macheix, J., Fluriet, A., Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 378 p.
- Mehmood, T., Siddique, F., Malik, S.A., Tabassam, Q., Khan, A.S., Karim, A., Shaheen, M.A. (2016). Antioxidant attributes, phenolics acids composition and biological activity of extracts from japanese persimmon (*Diospyros kaki*) as effected by organic solvents and drying technique. *Oxid Commun*, 39(3):2260-2279.
- Messaoudi, Z., Gmili, R.E., Khatib, F., Helmy, Y. (2009). Effect of pollination, fruit thinning and gibberellic acid application on 'Fuyu' kaki fruit development. *Acta Hort*, 833:233-237. doi:10.17660/ActaHortic.2009.833.37
- Mowat, A. (1990). The world scene-production and marketing. In: Collins RJ, (editor). *Charting the future. Proceedings of the first national non-astringent persimmon industry workshop*, The University of Queensland, Gatton College, 6-7 February, Brisbane, Australia, 37-51p.
- Murathan, Z.T. (2020). Phytochemical screening and antioxidant activity of *Diospyros Lotus* L. fruits grown in Turkey. *Acta Sci Pol Hortorum Cultus*, 19(2):49-55, doi: 10.24326/asphc.2020.2.5.
- Oksuz, T., Surek, E., Tacer-Caba, Z., Nilufer-Erdil, D. (2015). Phenolic contents and antioxidant activities of persimmon and red beet jams produced by sucrose impregnation. *Food Sci Technol*, 3(1):1-8. doi:10.13189/fst.2015.030101.
- Pérez-Jiménez, J., Torres, J.L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *J Agr Food Chem*, 59:12713-12724. doi: 10.1021/jf203372w.
- Pu, F., Ren, X.L., Zhang, X.P. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activity in fruits of six *Diospyros kaki* genotypes. *Eur Food Res Technol*, 237:923-932. doi:10.1007/s00217-013-2065-z.
- Sahan, Y., Gurbuz, O., Guldaz, M., Degirmencioglu, N., Bgenirbas, A. (2017). Phenolics, antioxidant capacity and bioaccessibility of chicory varieties (*Cichorium* spp.) grown in Turkey. *Food Chem*, 217:483-489. doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.108.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Assida, H., Kanazawa, K. (2003). Simultaneous of all polyphenols in vegetable, fruits and teas. *J Agr Food Chem*, 51:571-581, doi: 10.1021/jf020926l.
- Senica, M., Veberic, R., Grabnar, J.J., Stampar, F., Jakopic, J. (2016). Selected chemical compounds in firm and mellow persimmon fruit before and after the drying process. *J Sci Food Agric*, 96(9):3140-3147, doi:10.1002/jsfa.7492.
- Sun, J., Chu, Y., Wu, X., Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agr Food Chem*, 50:7449-7454, doi:10.1021/jf0207530.
- Suzuki, T., Someya, S., Hu, F., Tanokura, M. (2005). Comparative study of catechin compositions in five japanese persimmons (*Diospyros kaki* L.). *Food Chem*, 93:149-152, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.017.
- Yaqub, S., Farooq, U., Shafi, A., Akram, K., Murtaza, M. A., Kausar, T., Siddique, F. (2016). Chemistry and functionality of bioactive compounds present in persimmon. *J Chem*, 1-13. doi: 10.1155/2016/3424025.
- Yeşiloğlu, T., Aka Kacar, Y., Yılmaz, B., İncesu, M., Çimen, B. (2017). Bazı yerli ve yabancı Trabzon Hurması (*Diospyros kaki* L.) çeşit ve tiplerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu. *Türk Tarm-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(12):1580-1589.
- Yönel, S., Uylaşer, V., Yonak, S. (2008). Trabzon hurmasının bileşimi ve besleyici değeri. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 2008 Mayıs 21-23; Erzurum. s 339-342.
- Tuzcu, O., Yıldırım, B. (2000). Trabzon Hurması (*Diospyros kaki* L.) ve Yetiştiriciliği. TUBITAK Yayınları, TUBITAK Matbaası, Ankara. 24 s.
- Xu, J.G., Tian, C.R., Hu, Q.P., Luo, J.Y., Wang, X.D., Tian, X.D. (2009). Dynamic changes in phenolic compounds and antioxidant activity in

oats (*Avena nuda* L.) during steeping and germination, *J Agric Food Chem*, 57:10392-10398, doi:10.1021/jf902778j.

Vitali, D., Vedrinaro Dragojević, I., Šebečić, B. (2009). Effects of incorporation of integral raw materials and dietary fibre on the selected nutritional and functional properties of biscuits.

Food Chem, 114:1462-1469, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.032.

Zheng, Q.L., Nakatsuka, A., Itamura, H. (2006). Involvement of negative feedback regulation in wound induced ethylene synthesis in 'Saijo' persimmon. *J Agric Food Chem*, 54:5875-9. doi: 10.1021/jf060048h.



THE EFFECT OF BOVINE LACTOFERRIN ON THE MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF RAW MILK

Ayhan Duran*

Aksaray University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Aksaray, Turkey

Received/ Geliş: 23.02.2021; Accepted/ Kabul: 20.04.2021; Published online/ Online baskı: 27.04.2021

Duran, A. (2021). The effect of bovine lactoferrin on the microbiological properties of raw milk. GIDA (2021) 46 (3) 681-691 doi: 10.15237/gida.GD21041

Duran, A. (2021). Sığır laktoferrinin çiğ sütün mikrobiyolojik özelliklerine etkisi. GIDA (2021) 46 (3) 681-691 doi: 10.15237/gida.GD21041

ABSTRACT

Milk is a foodstuff that is very open to contamination depending on the way it is obtained. Also, it is a microbiologically perishable product in terms of the nutritional components it contains. Regarding both regulations and consumer awareness, it cannot be intervened substantially until the process of raw milk in the dairy farms. Therefore, due to the proliferation of Coliforms, especially *Pseudomonas* spp. and lactic acid bacteria, various problems may arise in both product and technology. The present study aimed to investigate the effect of lactoferrin, a natural inhibitor, on the microbiological properties of raw milk kept in the cold chain. As a result of the study, no inhibitory effect of lactoferrin on lactic acid bacteria was observed. However, it showed a significant antibacterial effect by inhibiting the growth of *Pseudomonas* spp. and Coliform ($P<0.05$). As the lactoferrin concentration increased, the antimicrobial effect increased significantly. This showed that lactoferrin can be used as a natural antimicrobial agent in cold systems of liquid foods.

Keywords: Raw milk, lactoferrin, *Pseudomonas* spp., Coliform, lactic acid bacteria

SIĞIR LAKTOFERRİNİN ÇİĞ SÜTÜN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ

ÖZ

Sütler elde edilme şekline göre kontaminasyona gayet açık bir gıda maddesidir. Aynı zamanda içerdikleri besin bileşenleri yönünden ise mikrobiyolojik olarak çok hızlı bozulabilen bir üründür. Gerek mevzuatlar yönünden gerekse bilinçli tüketim yönünden çiğ sütlerin işletmelerde işlemeye alınma sürecine kadar çok fazla müdahale edilememektedir. Bu nedenle çiğ sütlerde başta *Pseudomonas* spp. olmak üzere Koliformlar ve Laktik asit bakterilerin çoğalması nedeniyle gerek üründe gerekse teknolojide çeşitli sıkıntılar ortaya çıkabilmektedir. Çalışmamızda doğal bir inhibitör madde olan laktoferrin ilavesi ile soğuk zincirde tutulan çiğ sütlerin mikrobiyolojik özelliklerine etkisi incelenmiştir. Çalışma neticesinde laktoferrinin laktik asit bakterileri üzerine önemli düzeyde ($p<0.05$) inhibe edici bir etkisi görülmemiştir. Ancak *Pseudomonas* spp. ve Koliform bakterilerin çoğalmalarını engelleyerek önemli düzeyde ($p<0.05$) antibakteriyel etki göstermiştir. Laktoferrin konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etki de önemli düzeyde artmıştır. Bu durum laktoferrinin sıvı gıdaların soğuk sistemlerde doğal bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Çiğ süt, laktoferrin, *Pseudomonas* spp., koliform, laktik asit bakterisi

* Corresponding author/Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉: aduran@aksaray.edu.tr

☎: (+90) 542 895 53 03

☎: (+90) 382 288 35 25

Ayhan Duran; ORCID no: 0000-0002-4042-0988

INTRODUCTION

With the increase in collective life and collective consumption, the necessity of reliable methods for the protection and preservation of food has emerged (Öztürk et al., 2006). The use of artificial or natural antimicrobial agents to prevent or control the growth of pathogenic and deteriorating microorganisms has been an important issue in the food industry in recent years (Payne et al., 1994). In this context, interest in animal and plant-based inhibitors, organic acids, and bacteriocins has increased (Öztürk et al., 2006). It has been known for many years that milk, eggs, some herbs, probiotics, salts, and organic acids are natural antimicrobial agents. However, the structure-function relationship of such bioactive compounds has been put forward scientifically in recent years (Naidu, 2002). In addition to being an important source of milk in human nutrition, it also has a protective effect on infections (Ünal and Akalın, 2008). There are biologically active substances and immune system-supportive compounds in milk that is of importance in the nutrition of newborns and adults. These compounds are bioactive proteins, bioactive lipids, lactoferrin (LF), lactoperoxidase, lysozyme, N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAGase), and nisin. Lactoperoxidase and lysozyme are the most abundant antimicrobial enzymes in milk, while lactoferrin is the most abundant antimicrobial peptide (Yılmaz and Tosun, 2012). Antimicrobial proteins and peptides are produced by the secretory fluids produced by many organisms as a primary defense mechanism (Matijašić et al., 2020).

Lactoferrin is a member of the transferrin protein family and is an iron-binding glycoprotein. Lactoferrin is assumed to be the strongest antimicrobial agent in milk. Lactoferrin is produced in the mucosal epithelial cells of humans, cows, horses, dogs, and some rodents (Sebastián-Nicolás et al., 2020). Recent studies have shown that lactoferrin is also produced from trout eggs in fish using molecular biology techniques. This glycoprotein is abundantly found in colostrum and is the most abundant protein in milk after the casein. It is also found in body fluids such as blood plasma and amniotic fluids in

addition to mucosal secretions such as tears, saliva, vaginal fluid, and urine. Lactoferrin is found at 1.5-5.0 mg/ l in cow colostrum and approximately 100 µg/ml in milk. It is found at the level of 6-8 mg/ml in human colostrum and 20-200 µg/ml in milk (Steijns and van-Hooijdonk, 2000). This shows the importance of lactoferrin for humans, especially infants (Gür et al., 2010). Bovine lactoferrin consists of 689 amino acids and human lactoferrin consists of 691 amino acids, and their sequence similarity rate is 69%. The three-dimensional structure of bovine and human lactoferrin is very similar but not identical (Steijns and van-Hooijdonk, 2000). Lactoferrin is a glycosylated protein with a molecular weight of 80 kDa and approximately 700 amino acids. It is a simple polypeptide-chain coiled into two symmetrical lobes (N and C lobes) very similar to each other. The 1-332 amino acids of this polypeptide chain form the parts of the N lobe while the 334-703 amino acids form the C lobe. Both lobes have the ability to bind iron ions in the form of both Fe⁺² and Fe⁺³. Lactoferrin is a positively charged protein with an isoelectric point of 8.0-8.5 (Gonzalez-Chavez et al., 2009). Approximately 5-30% of a saturated lactoferrin molecule consists of iron ions. Lactoferrin containing 5% iron is called apolactoferrin, and lactoferrin saturated with iron is called hololactoferrin. Lactoferrin in human milk is found in the form of apolactoferrin (Alkın, 2008).

The antimicrobial activity of lactoferrin is mostly explained by two mechanisms. The first known antimicrobial property of lactoferrin is to prevent microbial growth by binding iron ion, which is the food source of the microorganism. For a long time, this was believed to be the only antimicrobial activity of lactoferrin (Branen and Davidson, 2000), and this antimicrobial activity was explained by the strong iron-binding capacity of apolactoferrin (Papademas et al., 2021). It has been reported iron deprivation leads to inhibition of cellular proliferation (Naidu, 2002). Normally, lactoferrin saturated with 6-8% iron in biological fluids, competes with siderophores to bind free iron, negatively affecting the growth of the bacteria. These effects are bacteriostatic on yeasts, Gram (+), and Gram (-) bacteria (Avcı,

2007). While these effects are strong for bacteria with high iron needs, these effects may decrease for bacteria with low iron needs (Temiz et al., 2008). The second mechanism is the direct interaction of the infectious agent and lactoferrin. The positive amino acids in lactoferrin interact with Gram (+) and Gram (-) and anionic molecules on the surface of acid and alcohol-resistant bacteria, leading to the destruction of the cells (Gonzalez-Chavez et al., 2009). The interaction of lactoferrin with the cell surface of Gram (-) bacteria is of importance. Lactoferrin potentially targets porins that allow molecules to pass through the membrane to bind (Alkin, 2008). The N lobe of lactoferrin with a strong cationic structure interacts with the anionic structure of Lipopolysaccharide (LPS) in the bacterial membrane, increasing the instability of the membrane and causing the LPS to separate from the membrane. As a result, membrane permeability increases, and bacteria are damaged (Steijns and van-Hooijdonk, 2000). The action mechanism of lactoferrin against Gram (+) bacteria is that the strongly positively charged part binds to anionic molecules on the bacterial surface and generally chooses lipoteichoic acid as the target. As a result of binding, the anionic structure of the cell is reduced and the interaction between the peptidoglycan layer in the bacterial cell wall and the lysozyme enzyme secreted from the mucosa is facilitated (Gonzalez-Chavez et al., 2009). As a result of this interaction between lactoferrin and lipopolysaccharide, the outer membrane is damaged with the effect of the antibacterial lysozyme enzyme (Yılmaz and Tosun, 2012). These reactions indicate that lactoferrin has also bactericidal properties against Gram (+) and Gram (-) bacteria (Gonzalez-Chavez et al., 2009). Lactoferrin's iron-binding stability has a wide pH limit and can form iron chelates even in very acidic environments such as pH 3. Although lactoferrin is highly resistant to proteolytic and oxidative degradation (Erga et al., 2000), it is sensitive to high temperatures (Wakabayashi et al., 2006). Also, lactoferricin, formed as a result of the degradation of lactoferrin by the enzyme pepsin, is thought to be responsible for the antimicrobial activity of lactoferrin and it has been reported that its

bactericidal effect is 100 -fold higher than that of lactoferrin (Duran and Kahve, 2017). Some researchers have investigated the antimicrobial effects of lactoferrin on various foodstuffs. Taylor et al. (2004) carried out researches and reported the antimicrobial effects of lactoferrin on the beef carcass, Al-Nabulsi et al. (2007) on dry sausages, Colak et al. (2008) on meatballs, Enrique et al. (2008) on wine, Del Olmo et al. (2012) on the chicken fillet, Quintieri et al. (2012) on Mozzarella cheese, Bravo et al. (2014) on red meat, Montiel et al. (2016) on ham, and Padrão et al. (2016) on the fresh sausage. However, the studies on milk are very limited.

The most important disadvantage is that the milk spoils in a short time as well as the production difficulty. Microbiological deterioration is the biggest factor in milk spoilage. Milk constitutes a good growth environment for microorganisms due to its rich composition. Microorganisms contaminate milk from various sources (dust, air, soil, human, the animal itself, tools, and equipment), especially milking conditions (Claeys et al., 2013). The main carbohydrate of milk is lactose. A limited number of microorganisms have the ability to obtain energy from lactose. Therefore, microorganisms with enzymes that hydrolyze lactose (lactic acid bacteria, Coliform group bacteria, and some of the Gram-negative bacteria) are more advantageous than other microorganisms. These microorganisms cause various deteriorations in milk such as rancidity and coagulation as a result of lactic acid production (Quigley et al., 2013). Milk factories obtain the raw materials they need from milk production units. Although small farms have the opportunity to supply milk as much as their daily needs from the immediate environment, large enterprises have to obtain milk from more distant centers and especially from large capacity production units, since their needs are high. In this case, it is not possible for the milk to reach the enterprise on the same day, and various quality problems occur (O'Connell et al., 2016). Raw milk is cold stored in farms or milk collection centers and then delivered to factories by refrigerated tankers (Walstra et al., 2006). However, albeit slowly, bacteria normally present in milk during

cold storage continue to develop, (Capodifoglio et al., 2016). The process that raw milk goes through from the producer to the factory is the basis of milk quality problems (Melda, 2019) and the source of milk spoilage (Walstra et al., 2006). The most effective bacteria groups in this process are lactic acid bacteria, Coliform bacteria, and psychrotroph bacteria, respectively. More than 50% of psychrotroph bacteria are *Pseudomonas* spp. (Walstra et al., 2006). The main way of avoiding the spoilage process of raw milk and maintaining the natural quality of the milk is to halt its bacterial activity (Ruusunen et al., 2013). The present study aimed to investigate the effect of different bovine lactoferrin (bLF) concentrations on the microbiological quality of raw milk that must be kept cold for a long time.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of milk and lactoferrin solution

The raw milk used in the present study was cow's milk due to its commercial value and was provided by Aksaray Cattle Breeders Association. After milking, the raw milk was brought to the laboratory via directly-cooled vehicles and cooled. The temperature and duration of the cold environment, the time-temperatures of the raw milk commercially in storage tanks and milk tankers were taken as reference. Accordingly, the temperature was 10 ± 2 °C and the time was 36 hours. Chemical analyzes of raw milk were performed in Aksaray TBMYO Private Food Control Laboratory and the results are shown in Table 1.

Table 1. Chemical analysis results of raw milk

Humidity%	87.70 ± 0.04
Fat (%)	3.58 ± 0.02
Protein (%)	3.30 ± 0.02
Lactose (%)	4.75 ± 0.03
pH	6.68 ± 0.01
Lactic acid (%)	0.135 ± 0.001

The lactoferrin used in the study was used as pure (85%) lactoferrin (Sigma, L9507) obtained from cow's milk. Lactoferrin was dissolved in sterile-deionized water and a 20 mg/mL stock solution

was prepared first. Three different concentrations, 0 mg/mL, 2.5 mg/mL and 5.0 mg/mL (Payne et al., 1994; Murdock and Matthews, 2002; Quintieri et al., 2019) were used in the study. The lactoferrin solutions prepared were added to the raw milk stored in three different containers. Microbiological analyzes were carried out by taking samples from cold-stored milk at 0, 12, 24, and 36 hours according to the ISO/FDIS 8086 (2004) method.

Microbiological analyses

Colony counts were performed for lactic acid bacteria using Man Rogosa Sharpe Agar (Oxoid, CM1153) (ISO 15214:1998). Incubation for lactic acid bacteria count was performed at 30 ± 2 °C for 72 hours under anaerobic conditions. After incubation, white and opaque colonies were enumerated. For the confirmation test, samples were taken from the colonies, and Gram-staining, cellular shape under a microscope, and catalase tests with hydrogen peroxide were performed. Colony enumerations were performed for total Coliform bacteria using the Violet Red Bile Agar (Oxoid, CM0978) medium (APHA, 1992). Incubation for Coliform bacteria count was performed at 32 ± 2 °C for 24 hours. Following the incubation, the number of ringed purple-red appearing colonies was determined. Samples were taken from the colonies for validation testing and inoculated into Brilliant Green Lactose Broth (Merck, 16025) tubes. The samples were checked for gas production after 48 hours at 35 ± 2 °C. *Pseudomonas* spp. enumerations were performed using *Pseudomonas* Agar (Bioneks BM15608) medium supplemented with Penicillin and Pimarisin. *Pseudomonas* spp. colonies were counted after 25 ± 2 °C incubation for 48 hours. Samples taken randomly from Petri dishes with a colony number of less than 150 were proliferated on Nutrient Agar (Merck, 105450). Oxidase and glucose fermentation (TGE Agar, Oxoid CM0127) validation tests were applied to these samples. *Pseudomonas* spp. were characterized by a positive reaction to the oxidase test and a negative response to glucose fermentation (ISO/TS 11059:2009). Bacterial count results in the study are given as log CFU (colony forming units)/mL.

Statistical analyses

All the analyses were carried out in four replicates and the data obtained as a result of the analyses were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the SPSS 22.0.0 package software (SPSS Inc., Chicago, USA). The Duncan analysis was adopted to compare the effects of statistically different concentrations (0, 0.25, 0.50 mg/mL LF), while the General Linear Model Repeated Measures analysis was used to compare the effects of retention times (0, 12, 24, 36 hours). The differences between the mean values were considered significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSIONS

The data obtained as a result of the study are given in Table 2. The samples were divided into three groups as LF-free milk, 2.5 mg/mL- and 5.0 mg/mL-LF milk according to the method of administration, and changes both within groups and according to time were investigated. Comparing the growth rate in LF-free milk, from Table 2.

high to low, it was sorted as *Pseudomonas* spp., Coliforms, and lactic acid bacteria, respectively. The highest growth rate was 5.07 ± 0.07 log CFU/mL in *Pseudomonas* spp. While mesophilic bacteria are kept to a minimum during cold storage and transportation, psychrotrophic bacteria, especially *Pseudomonas* species, dominate the microbiota of raw milk (Tanaka et al., 2018). Although the optimum temperatures of Lactic acid bacteria and Coliforms in raw milk are above 20 °C (Walstra et al., 2006), there are some species of the Coliform bacteria group that can grow rapidly even at 5-7 °C (Robinson, 2005). The number of Coliform bacteria increased at a higher rate (3.62 ± 0.08 log CFU/mL) during the maintenance period compared to Lactic acid bacteria (2.99 ± 0.10 log CFU/mL). Lactic acid bacteria are common in milk and dairy products, Gram-positive, thermophilic-mesophilic, and generally potentially probiotic (Giraffa, 2012).

Table 2. The microbial changes in the raw milk during storage (10 ± 2 °C).

	Hour 0	Hour 12	Hour 24	Hour 36
Lactic acid bacteria (log CFU/mL)				
Milk	1.96 ± 0.05^d	2.25 ± 0.05^{c1}	2.86 ± 0.06^{b1}	2.99 ± 0.10^{a1}
Milk + LF (2.5 mg/mL)	1.96 ± 0.05^d	2.25 ± 0.05^{c1}	2.63 ± 0.06^{b2}	2.84 ± 0.06^{a1}
Milk + LF (5.0 mg/mL)	1.96 ± 0.05^d	2.24 ± 0.06^{c1}	2.44 ± 0.05^{b3}	2.56 ± 0.06^{a2}
Coliforms (log CFU/mL)				
Milk	2.06 ± 0.06^d	2.87 ± 0.05^{c1}	3.41 ± 0.09^{b1}	3.62 ± 0.08^{a1}
Milk + LF (2.5 mg/mL)	2.06 ± 0.06^d	2.86 ± 0.06^{c1}	3.19 ± 0.09^{b2}	3.25 ± 0.06^{a2}
Milk + LF (5. mg/mL)	2.06 ± 0.06^c	2.52 ± 0.04^{b2}	3.08 ± 0.07^{a2}	3.19 ± 0.08^{a2}
<i>Pseudomonas</i> spp. (log CFU/mL)				
Milk	1.56 ± 0.06^d	2.42 ± 0.08^{c1}	4.28 ± 0.63^{b1}	5.07 ± 0.07^{a1}
Milk + LF (2.5 mg/mL)	1.56 ± 0.06^d	2.26 ± 0.22^{c12}	2.97 ± 0.07^{b2}	3.23 ± 0.08^{a2}
Milk + LF (5.0 mg/mL)	1.56 ± 0.06^c	1.98 ± 0.07^{b2}	2.83 ± 0.06^{a2}	2.87 ± 0.06^{a3}

Bearing different superscripts row-wise (alphabet) and column wise (numeric) differ significantly ($p < 0.05$).

In the present study, lactic acid bacteria counts increased in all three groups (LF-free, treated with 2.5 mg/mL and 5.0 mg/mL LF) during the storage period, albeit slightly. As seen in Table 2, there was no significant effect of lactoferrin on the growth rate of lactic acid bacteria. Evaluating the storage periods separately, Lactic acid bacteria counts were found to be lower (2.56 ± 0.06 log CFU/mL) compared to the other two groups at

the end of 36 hours of storage and in the milk with 5.0 mg/mL LF. These results showed us that although lactoferrin does not have a stopping effect on Lactic acid bacteria in milk, it can only be effective at 5.0 mg/mL LF after 36 hours of storage. Kim et al. (2016), similar to our study, studied the antibacterial effect of bovine lactoferrin on some Lactic acid bacteria species, Coliform and *Pseudomonas* bacteria. The

researchers used synthetic peptides containing the C-lobe sequence of lactoferrin instead of bovine lactoferrin. They performed trials on *Escherichia coli* in the Coliform group, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae* in the *Pseudomonas* group, and *Lactobacillus acidophilus* in the lactic acid group. Accordingly, it was measured every 6 hours and left to incubation for 24 hours and antimicrobial effects at different doses (0.75, 1.5, 3.0 mg/mL) were examined. As a result of the measurements, the proliferation of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, and *Escherichia coli* were prevented. Also, as the dose increased, the antimicrobial effect increased. However, no bacteriostatic effect was observed on *Lactobacillus acidophilus*. Matijašić et al., (2020) examined the antimicrobial effects of seven different lactoferrins isolated from whey and produced in the pilot plant by the disk diffusion method. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Clostridium difficile*, *Klebsiella oxytoca*, and *Clostridium perfringens* were selected as potentially pathogenic indicator bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus casei* were selected as lactic acid bacteria. As a result of the study, partial or complete inhibitory properties were observed on all bacteria except for lactic acid bacteria and *Clostridium* bacteria. The resistance of lactic acid bacteria to lactoferrin inhibition has been associated with their probiotic properties (Chen et al., 2013).

The Coliform counts in LF-free milk and milk supplemented with 2.5 mg/mL LF continued to increase during the storage period. On the other hand, the Coliform count was 3.08 ± 0.07 log CFU/mL at the end of 24 hours of storage in the 5.0 mg/mL LF group, while it was counted as 3.19 ± 0.08 log CFU/mL at the end of 36 hours. The Coliform bacteria count remained virtually constant. It was shown that a high rate of LF solution (5.0 mg/mL) almost stopped the growth rate of Coliforms at the end of a 24-hour-storage. As seen in Table 2, 5.0 mg/mL LF started to have a significant effect on Coliforms from the 12th hour. The effect of 2.5 mg/mL LF level on

Coliform bacteria was found to be significant after 24 hours of storage. Examining the bacterial counts Coliforms during storage, it was reported that this effect was not in a growth-inhibiting way, but in a growth-slowing way. After 36 hours of storage, Coliform counts in milk with 2.5 mg/mL LF was measured to be 3.25 ± 0.06 log CFU/mL, and 3.62 ± 0.08 log CFU/mL in LF-free milk. In the present study, the result related to the inhibitory effect of bLF on Coliform bacteria was consistent with the results previously reported by some researchers. Naidu et al., (1993) investigated the antimicrobial relationship between bovine lactoferrin (bLF) and Coliforms such as *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. The researchers have stated that lactoferrin had a bacteriostatic effect on these Coliform bacteria and this effect was explained by a third theory of action mechanism. Accordingly, the mechanism is that Lactoferrin binds to these structures with some ligands instead of directly binding to Lipopolysaccharides or Porins. As a result, the researchers have reported that bLF would damage the outer membrane of Coliform bacteria and cause bacteriosis with changes in permeability. Kuttila et al. (2003) investigated the antibacterial effect of bovine lactoferrin on Gram-negative and Gram-positive pathogens. The researchers studied *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* as Gram-negative bacteria, *Staphylococcus aureus*, and coagulase-negative staphylococci (CNS) as Gram-positive bacteria. The incubation period in the study was 20 hours, and the LF concentrations used were 0.67 mg/ml, 1.67 mg/ml, and 2.67 mg/ml. Accordingly, the inhibition effect increased with increasing concentration of lactoferrin. The most effective inhibitory activity of LF was seen against Gram-negative *E. coli* and *P. aeruginosa*. The effect of lactoferrin on the release of LPS to Gram-negative bacteria and damage to the outer membrane of the bacteria (Appelmek et al., 1994) has revealed the view that Gram-positives is more than damaging through basic nutritional deficiency by disconnecting Fe uptake. This result can be considered as another reason for the weak inhibitory effect of lactoferrin on lactic acid bacteria in the present study. Also, Komine et al. (2005) examined the antimicrobial effect of bovine lactoferrin (bLF) on *E. coli* in milk

with mastitis. The researchers have reported that the addition of 0.5 mg/mL and 1.0 mg/mL bovine lactoferrin (bLF) in milk stored for 24 hours inhibited the growth of this bacteria. Padrão et al., (2016) applied edible film coatings to give antimicrobial properties to the casings of fresh sausages. The researchers revealed that the casings supplemented with bovine lactoferrin (bLF) showed a bactericidal effect on *E. coli* in the Coliform group. Komine et al., (2005) and Padrão et al., (2016) associated the inhibition effect of bLF on these bacteria with the ability of bLF to chelate iron ions.

As seen in Table 2, the *Pseudomonas* spp. counts in LF-free milk and 2.5 mg/mL LF continued to increase during the storage period. On the other hand, at the end of 24-hour storage, the *Pseudomonas* counts in the 5.0 mg/mL LF group were significantly lower. While this number was 2.83 ± 0.06 log CFU/mL during 24 hours of storage, it was measured as 2.87 ± 0.06 log CFU/mL at the end of 36 hours. This shows the bacteriostatic effect of LF (5.0 mg/mL) on *Pseudomonas* spp. Also, both 2.5 mg/mL and 5.0 mg/mL bLF were showed a significant slowing effect on *Pseudomonas* from the 12th hour of storage. At the end of storage, the effect of 5.0 mg/mL LF on *Pseudomonas* was much higher than the solution at 2.5 mg/mL LF. At the end of storage, *Pseudomonas* spp. counts in LF-free milk were found to be as 5.07 ± 0.07 log CFU/mL, while it was determined to be 3.23 ± 0.08 and 2.87 ± 0.06 log CFU/mL in the groups treated with 2.5 and 5.0 mg/mL LF, respectively. The dominant microorganisms that limit the shelf life of chilled raw milk (tank milk) are *Pseudomonas* spp. (Ternström et al., 1993). Kim et al. (2008) studied the antimicrobial effect of bovine lactoferrin on *Pseudomonas* spp. The activity of lactoferrin added to liquid media activity at different concentrations (15, 7.5, 3.8, 1.9, 0.9, and 0.45 mg/mL) against *Pseudomonas* spp. was investigated. The researchers found that lactoferrin inhibited the growth of the tested *Pseudomonas* strains. The higher the lactoferrin concentration, the higher the antibacterial effect proportionately. The researchers also found bovine lactoferrin ligands with a different

molecular mass in all strains. Based on these results, it was concluded that the interaction mechanism between the lactoferrin molecule and *Pseudomonas* spp. was related to the ligands found in bacterial cells. At the end of the study, it has been reported that bovine lactoferrin can be used in dairy products, raw milk, and fruit products for protection from pathogenic bacteria. Among *Pseudomonas* spp., some species cause important respiratory disorders such as cystic fibrosis and are highly resistant to antibiotics (Hector et al., 2014). The most important of these is *Pseudomonas aeruginosa*, which is a clinical pathogen and forms a resistant biofilm. Kamiya et al. (2012) investigated the effect of lactoferrin at different concentrations (0.5, 2.0, 10 mg/mL) during seven days of incubation in preventing biofilm development of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Lactoferrin had an inhibitory effect on biofilm formation in eight of the nine clinical isolates after one-day-incubation. This effect is explained by lactoferrin's iron-chelating properties.

CONCLUSION

There are great risks in raw products that are liquid like milk and are transported and stored in metal tanks along the cold chain (Brooks and Flint, 2008). It is important that some species of Coliforms and *Pseudomonas* (some strains of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*) are pathogenic (Meier et al., 2018). In the present study, it was investigated whether the natural inhibitory substance lactoferrin can be used in combination with the cold chain in the process from the moment the raw milk obtained from the animal to the process in the farm, and how it will cause a change in the microbiological quality of the milk. As a result of the study, lactoferrin did not significantly inhibit the growth of lactic acid bacteria. On the other hand, showed antibacterial effects on *Pseudomonas* spp. and Coliforms. As the lactoferrin concentration increased, the antibacterial effect increased. This study showed that bovine lactoferrin can be used in products that will not undergo heat treatment for a certain period or avoid the pathogenic properties of bacteria.

CONFLICT OF INTEREST

The author declares no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Aksaray University Scientific Research Projects (Project No: 2015-016) for their support of a large part of this work.

REFERENCES

- Al-Nabulsi, A.A., Holley, R.A. (2007). Effects of *Escherichia coli* O157:H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin in broth and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters. *Int Food Microbiol*, 113: 84–91, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.019>.
- Alkın, E. (2008). Laktoferrin ve gıdalarda kullanımı. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi*, 10: 31-38.
- APHA (1992). In: *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, Marshall, R.T. (Ed)., 16th ed., American Public Health Association. Washington, DC., p.546.
- Appelmelk, B.J., Yun-qing, A., Geerts, M., Thijs, B.G., Boer, H.A., Maclaren, D.M., Graaff, J., Nuijens, J.H. (1994) Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect. Immun.*, 62: 2628-2632.
- Avcı, G. (2007). Laktoferrinin Biyolojik Özellikleri ve Hastalıklarla İlişkisi. *Afyon Kocatepe Üniv. Fen ve Mühend Bilimleri Derg*, 7 (1): 23-34.
- Barbiroli, A., Bonomi, F., Capretti., Iematti, S., Manzoni, M., Piergiorganni L., Rollini, M. (2012). Antimicrobial activity of lysozyme and lactoferrin incorporated in cellulose-based food packaging. *Food Control*, 26: 387-392, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.046>.
- Branen, J. and Davidson, P.M. (2000) Activity of hydrolysed lactoferrin against foodborne pathogenic bacteria in growth media: the effect of EDTA. *Lett of Appl Microbiol*, 30: 233–237, <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00711.x>.
- Bravo, D., de Alba, M., Medina, M. (2014). Combined treatments of high-pressure with the lactoperoxidase system or lactoferrin on the inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carpaccio. *Food Microbiol*, 41: 27-32, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.010>.
- Brooks, J.D., Flint, S.H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int Food Sci and Technol*, 43: 2163–2176, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01839.x>.
- Capodifoglio, E., Vidal, A.M.C., Lima, J.A.S., Bortoletto, F., D'Abreu, L.F., Gonçalves, A.C.S., Vaz, A.C.N. (2016). Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk, *J. Dairy Sci.*, 99: 5214-5223, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10453>.
- Chen, P.W.; Jheng, T.T.; Shyu, C.L.; Mao, F.C. (2013). Antimicrobial potential for the combination of bovine lactoferrin or its hydrolysate with lactoferrin-resistant probiotics against foodborne pathogens. *J Dairy Sci.*, 96: 1438–1446. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6112>.
- Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., Block, J.D., Dewettinck, K., Dierick, K., Zutter, L.D., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control*, 31: 251-262, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>.
- Colak, H., Hampikyan, H., Bingol, E.B., Aksu, H. (2008). The effect of nisin and bovine lactoferrin on the microbiological quality of turkish-style meatball (tekirdağ köfte). *J Food Safety*, 28: 355–375, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2008.00105.x>.
- Del Olmo, A., Calzada, Nunez, M. (2012). Effect of lactoferrin and its derivatives, high hydrostatic pressure, and their combinations, on *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas fluorescens* in chicken filets. *Innovative Food Sci & Emerg Technol*, 13: 51–56, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.016>.
- Duran, A., Kahve, H.I. (2017). The use of lactoferrin in food industry, *Academic J Sci*, 07(02): 89-94.

- EFSA (2012). Scientific opinion on bovine lactoferrin, *Eur Food Saf Authority J*, Vol. 10, Iss. 5, <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2701>.
- Enrique, M., Marcos, J.F., Yuste, M., Martínez, M., Vallés, S., Manzanares, P. (2008). Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *Int J Food Microbiol*, 127: 229–234, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.011>.
- Erga, K.S., Peen, E., Tenstad, O., Reed, R.K. (2000). Lactoferrin and anti-lactoferrin antibodies: Effects of ironloading of lactoferrin on albumin extravasation in different tissues in rats. *Acta Physiologica Scandinavica*, 170(1): 11-19, <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00754.x>.
- Giraffa, G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Eng. Life Sci.*, 12(4): 391–398. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100118>.
- Gonzalez-Chavez, S.A., Arevalo Gallegos, S., Roscon Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrobial Agents*, 33(4): 301.e1–301.e8, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020>.
- Gür, F., Güzel, M., Öncül, N., Yıldırım, Z., Yıldırım M. (2010). Süt serum proteinleri ve türevlerinin biyolojik ve fizyolojik aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 8(1): 23-31.
- Hector, A., Kröner, C., Carevic, M., Bakele, M., Rieber, N., Riethmüller, J., Griese, M., Zissel, G., Hartl, D. (2014). The chemokine CCL18 characterises *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J.*, 44: 1608-1615, <https://doi.org/10.1183/09031936.00070014>.
- ISO 15214 (1998). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria. Colony-count technique at 30 °C. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/FDIS 8086 (2004). Dairy plant - hygiene conditions - General guidance on inspection and sampling procedures. Final Draft international standard. Geneva, CH: International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- ISO/TS 11059 (2009). Milk and milk products. Method for the enumeration of *Pseudomonas* spp., International Standardization Organization ed., Geneva, Switzerland.
- Kamiya, H., Ehara, T. ve Matsumoto T. (2012). Inhibitory effects of lactoferrin on biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Chemother*, 18: 47-52, <https://doi.org/10.1007/s10156-011-0287-1>.
- Kim, WS., Rahman, M.M., Shimazaki K. (2008). Antibacterial activity and binding ability of bovine lactoferrin against *Pseudomonas* spp. *J Food Saf*, 28: 23–33, <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2007.00092.x>.
- Kim, WS., Ohashi, M., Shimazaki K. (2016). Inhibitory effects of synthetic peptides containing bovine lactoferrin C-lobe sequence on bacterial growth. *Korean J Food Sci Anim Resour.*, 36(4): 452-457, <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.452>.
- Komine, K., Komine, Y., Kuroishi, T., Kobayashi, J., Obara, Y., Kumagai, K. (2005). Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. *J. Vet. Med. Sci.*, 67: 667–677, <https://doi.org/10.1292/jvms.67.667>.
- Kuttila, T., Pyörälä, S., Saloniemi, H., Kaartinen, L. (2003). Antibacterial effect of bovine lactoferrin against udder pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44: 35-42, <https://doi.org/10.1186/1751-0147-44-35>.
- Matijašić, BB., Oberckal, J., Lorbege, PM., Paveljšek, D., Skale, N., Kolenc, B., Gruden, Š., Ulrih, NP., Kete M., Justin MZ. (2020). Characterisation of lactoferrin isolated from acid whey using pilot-scale monolithic ion-exchange chromatography. *Processes*, 8(7): 804, <https://doi.org/10.3390/pr8070804>.
- Meier, F., Lacroix, C., Meile, L., Jans, C. (2018). Enterococci and pseudomonads as quality indicators in industrial production and storage of mozzarella cheese from raw cow milk. *Int Dairy J*,

- 82: 28-34, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.02.010>.
- Melda, K. (2019). Süt ve süt ürünleri endüstrisinin sorunları ve çözümlerinin analizi: Tekirdağ örneği. Namık Kemal Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü İşletme Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, Türkiye, 33 s.
- Montiel, R., Martín-Cabrejas, I., Medina, M. (2016). Reuterin, lactoperoxidase, lactoferrin and high hydrostatic pressure on the inactivation of food-born pathogens in cooked ham. *Innovative Food Sci Emerging Technol*, 35: 111–118, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.013>.
- Naidu, A.S. (2002). Activated lactoferrin - A new approach to meat safety. *Food Technol*, 56 (3): 40-45.
- Naidu, S.S., Svensson, U., Kishore, A.R., Naidu, A.S. (1993). Relationship between antibacterial activity and porin binding of lactoferrin in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 37: 240–245, <https://doi.org/10.1128/AAC.37.2.240>.
- O'Connell, A., Ruegg, P.L., Jordan, K., O'Brien, B., Gleeson, D. (2016). The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *J. Dairy Sci.*, 99: 3367–3374, <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10495>.
- Öztürk, Ü., Gürbüz, Ü., Çalım, H.D. (2006). Besinlerin muhafazasında bazı doğal antimikrobiyal sistemlerin rolü ve önemi. Türkiye 9. Gıda Kongresi; 24-26 Mayıs 2006, Bolu, Türkiye.
- Padrão, C., Gonçalves, S., Silva J.P., Sencadas, V. Lanceros-Méndez, S., Pinheiro A.C., Vicente, A.A., Rodrigues, L.R., Dourado, F. (2016). Bacterial cellulose-lactoferrin as an antimicrobial edible packaging. *Food Hydrocolloids*. 58: 126-140, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.019>.
- Papademas, P., Kamilari, E., Aspri, M., Anagnostopoulos, D.A., Mousikos, P., Kamilaris, A., Tsaltas, D. (2021). Investigation of donkey milk bacterial diversity by 16S rDNA high-throughput sequencing on a cyprus donkey farm. *Journal of Dairy Science*, Vol.104, No.1, <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19242>.
- Payne, K.D., Oliver, S.P., Davidson, P.M. (1994) Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *J Food Prot*, 57: 62–65, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.1.62>.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37: 664–698, <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>.
- Quintieri, L., Caputo, L., Monaci, L., Deserio, Morea, M., Baruzzi, F. (2012). Antimicrobial efficacy of pepsin-digested bovine lactoferrin on spoilage bacteria contaminating traditional Mozzarella cheese. *Food Microbiol* 31(1): 64–71, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.015>.
- Quinteri, L., Pistillo P.B., Caputo, L., Favia, P., Baruzzi, F. (2013). Bovine lactoferrin and lactoferricin on plasma-deposited coating against spoilage *Pseudomonas* spp. *Innovative Food Sci & Emer Technol*, 20: 215–222, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.013>.
- Quintieri, L., Zühlkeb, D., Fanellia, F., Caputo, L., Liuzzia, V.C., Logrieco, A.F., Hirschfeldb, C., Becherb, D., Riedelb, K. (2019). Proteomic analysis of the food spoiler *Pseudomonas fluorescens* ITEM 17298 reveals the antibiofilm activity of the pepsin-digested bovine lactoferrin. *Food Microbiol*, 82: 177–193, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.003>.
- Ruusunen, M., Salonen, M., Pulkkinen, H., Huuskonen, M., Hellström, S., Revez, J., Hanninen, M.L., Fredriksson-Ahomaa, M., Lindström, M. (2013). Pathogenic bacteria in finnish bulk tank milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol.10, No.2, <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1284>.
- Robinson, R.K. (Ed.) (2005) *Dairy microbiology handbook: The microbiology of milk and milk products*. Third Edition, John Wiley and Sons, Inc., Wiley Interscience Press, New York, USA, 737 p.
- Sebastián-Nicolás, J.L., González-Olivares, L.G., Vázquez-Rodríguez, G.A., Lucho-Constantino, C.A., Castañeda-Ovando, A. (2020). Valorization of whey using a biorefinery. *Biofuels, Bioprod.*

- Bioref.*, 14: 1010–1027, <https://doi.org/10.1002/bbb.2100>.
- Steijns, J.M., van-Hooijdonk, A.C.M. (2000). Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British J Nutr*, 84, Iss. S1: 11-17, <https://doi.org/10.1017/S0007114500002191>.
- Tanaka, C., Yamada, K., Takeuchi, H., Inokuchi, Y., Kashiwagi, A., Toba, T. (2018). A lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk. *Appl and Environ Microbiol*, 84, Iss. 18: e00111-18, <https://doi.org/10.1128/AEM.00111-18>.
- Taylor, S., Brock, J., Kruger, C., Berner, T., Murphy, M. (2004). Safety determination for the use of bovine milk-derived lactoferrin as a component of an antimicrobial beef carcass spray. *Regul Toxicol Pharmacol*, 39: 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2003.10.001>.
- Temiz, H., Tarakçı, Z., Aylkut, U. (2008). Süt ve ürünlerinde mikroorganizmaları azaltmada alternatif yöntemler. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, Türkiye.
- Ternström, A., Lindberg, A.M., Molin, G. (1993). Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 25–34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03403.x>.
- Tonguc-Altin, K., Sandalli, A., Duman, G., Selvi Kuvvetli, S., Topçuoğlu, N., Külekçi, G. (2015). Development of novel formulations containing lysozyme and lactoferrin and evaluation of antibacterial effects on *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli*. *Archives of Oral Biology*, 60(5): 706–714, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.02.004>.
- Ünal, G., Akalın, S.A. (2008). Süt proteini kaynaklı peptidlerin antibakteriyel aktivitesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum, Türkiye.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M. (2006). Lactoferrin research, technology and applications. *Int Dairy J*, 16: 1241-1251, <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.013>.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. (2006). *Dairy science and technology*, Second Edition, Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton FL, USA, 763 p.
- Yılmaz, B., Tosun, H. (2012). Sütte bulunan doğal antimikrobiyal sistemler ve bunların gıda sanayinde kullanımı. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 9 (1): 11-20.

KANATLI ETLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* YAYGINLIĞI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN, ANTİBİYOTİK DİRENÇ VE ENTEROTOKSİN GENLERİNİN BELİRLENMESİ*

Çilem Kısa, Yasin Tuncer**

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

Geliş / Received: 17.12.2020; Kabul / Accepted: 09.03.2021; Online baskı / Published online: 27.04.2021

Kısa, Ç., Tuncer, Y. (2021). Kanatlı etlerinde *Staphylococcus aureus* yaygınlığı ve antibiyotik direnç profillerinin, antibiyotik direnç ve enterotoksin genlerinin belirlenmesi. *GIDA* (2021) 46 (3) 692-706 doi: 10.15237/gida. GD21048

Kısa, Ç., Tuncer, Y. (2021). Determination of Staphylococcus aureus prevalence and antibiotic resistance profiles, antibiotic resistance and enterotoxin genes in poultry meats. GIDA (2021) 46 (3) 692-706 doi: 10.15237/gida. GD21048

ÖZ

Bu çalışmada, Isparta ve Antalya illerinde perakende satışı yapılan kanatlı etlerinde (32 piliç, 9 hindi, 9 bıldırcın) *Staphylococcus aureus* yaygınlığının araştırılması, antibiyotik direnç profilleri ve direnç genlerinin yanı sıra enterotoksin genleri varlığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Kanatlı etlerinden muhtemel *S. aureus* izolasyonunda Baird Parker agar besiyeri kullanılmıştır. İzolatların tür düzeyinde tanısı *S. aureus*'da termostabil nükleaz genine (*nuc*) özgü primer çifti kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile yapılmıştır. 130 muhtemel *S. aureus* izolatının 16'sında *nuc* genine özgü 458 bp büyüklüğünde ampikonlar elde edilmiştir. Kanatlı eti örneklerinde *S. aureus* bulunma sıklığı % 20 (10/50) bulunmuştur. Koagülaz testi, *S. aureus* izolatlarının tamamının koagülaz pozitif olduğunu göstermiştir. Disk difüzyon testi, izolatların tamamının (% 100) kloramfenikole ve teikoplanine duyarlı, penisilin G'ye ise dirençli olduğunu göstermiştir. İzolatların % 81.25'inin (13/16) metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) olduğu tespit edilmiştir. PZR işlemi sonucu *S. aureus* suşlarında en sık rastlanan antibiyotik direnç geninin *blaZ* (% 62.5, 10/16) olduğu tespit edilmiştir. *S. aureus* suşlarının hiçbirinde *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* geni varlığı belirlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: Kanatlı eti, *Staphylococcus aureus*, antibiyotik direnç, antibiyotik direnç geni, enterotoksin geni

DETERMINATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PREVALENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILES, ANTIBIOTIC RESISTANCE AND ENTEROTOXIN GENES IN POULTRY MEATS

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the prevalence of *Staphylococcus aureus* in poultry meats (32 chickens, 9 turkeys, 9 quails) sold in Isparta and Antalya provinces, and to determine the presence of enterotoxin genes as well as antibiotic resistance profiles and resistance genes. Baird Parker agar

*Bu çalışma Çilem Kısa'nın yüksek lisans tez çalışmasıdır. Bu çalışmanın bir kısmı Uluslararası Genç Araştırmacılar Öğrenci Kongresi (IYRSC 2019) Burdur/Türkiye'de sözlü sunum olarak sunulmuş ve kongre kitabında bildiri olarak basılmıştır. *This paper is MSc thesis of Çilem Kısa. This study was presented as a oral presentation at the International Young Researchers Student Congress (IYRSC 2019) Burdur/Turkey, and a part of this study was published in the book of proceedings.*

** Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding Author

✉ yasintuncer@sdu.edu.tr

☎ (+90) 246 211 1713

☎ (+90) 246 237 0437

Çilem Kısa; ORCID no: 0000-0001-9209-1701

Yasin Tuncer; ORCID no: 0000-0002-2075-5027

medium was used to isolate presumptive *S. aureus* from poultry meats. The species-level identification of isolates was done by polymerase chain reaction (PCR) using primer pair specific to the thermostable nuclease gene (*nuc*) in *S. aureus*. As a result of the PCR analysis, amplicons of 458 bp specific to the *nuc* gene were obtained in 16 of 130 presumptive *S. aureus* isolates. The frequency of *S. aureus* in poultry meat samples was found to be 20% (10/50). Coagulase test showed that all the *S. aureus* isolates were coagulase positive. Disk diffusion test showed that all of the isolates (100 %) were susceptible to chloramphenicol and teicoplanin and resistant to penicillin G. It was determined that 81.25 % (13/16) of the isolates were methicillin resistant *S. aureus* (MRSA). The most common antibiotic resistance gene in *S. aureus* strains was found to be *blaZ* (62.5 %, 10/16) as a result of PCR. The presence of *sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see* genes was not detected in any of the *S. aureus* strains.

Keywords: Poultry meat, *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, antibiotic resistance gene, enterotoxin gene

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, *Bacillales* sınıfına, *Staphylococcaceae* familyasına ve *Staphylococcus* cinsine ait Gram pozitif, kok morfolojisinde, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hareketsiz, hemolitik, oksidaz-negatif, katalaz-pozitif ve koagülaz-pozitif bir bakteridir (Gulzar ve Zehra, 2018; Pal vd., 2020). *S. aureus*, kümeleşmiş koklar veya üzüm salkımına benzer kümeleşmiş koklar şeklinde mikroskopik morfoloji gösterir (Loir vd., 2003; Schelin vd., 2011). *S. aureus* toplumsal ve hastane kaynaklı hastalıklarla ilişkili yaygın bir patojendir (Lee, 2003; Pereira vd., 2009; Kadariya vd., 2014; Pal vd., 2020). İnsanlarda zatürre, ameliyat sonrası yara enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları, bakteremi ve endokardit gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Gulzar ve Zehra, 2018). *S. aureus* antibiyotiklere direnç gösteren mikroorganizmalar arasında halk sağlığını tehdit eden önemli bir bakteridir (Pal vd., 2020). Antibiyotikler hücre duvarı sentezini, protein sentezini, nükleik asit sentezini ve metabolik yolları inhibe ederek bakteriler üzerinde etkili olan antibakteriyel ajanlardır. Antibiyotiğe dirençli bakteriler, hem doğal (intrinsic) hem de kazanılmış (acquired) direnç mekanizmaları ile antibiyotiklerin etkisini engeller. Transformasyon, transdüksiyon, plazmitler veya transpozonlarla konjugasyon ve mutasyon antibiyotik direnç kazanım yöntemleridir (Donham vd., 2010). *S. aureus*, kazanılmış antimikrobiyal direnç geliştirme potansiyeli yüksek bir mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır. *S. aureus* suşları penisilin, metisilin ve vankomisin gibi birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmıştır. Metisilin dirençli *S. aureus* dünya genelinde büyük bir sorun haline gelmiş ve

hem hastanelerde hem de toplumda giderek daha fazla tespit edilmeye başlanmıştır (John vd., 2019).

Halk sağlığı açısından önemli sorunlar oluşturmasının yanı sıra, *S. aureus* gıdalarda çoğalıp ürettiği enterotoksinler ile gıda zehirlenmelerine de sebep olabilmektedir (Lee, 2003; Pereira vd., 2009; Kadariya vd., 2014; Pal vd., 2020). Isıl işlem ile gıdalardan *S. aureus* hücreleri elimine edilebilmekte, ancak ürettikleri ısıya dirençli toksinler stafilkokal gıda zehirlenmelerine neden olabilmektedir (Schelin vd., 2011). Stafilkokal enterotoksinler, biyolojik aktiviteleri ve yapısal ilişkileri nedeniyle pirojenik toksin süperantijen ailesinin üyeleri olarak sınıflandırılmıştır (Omoe vd., 2002; Argudín vd., 2012). Toksik şok sendromu toksini (TSST-1), stafilkokal enterotoksinler (SEA'dan SEE'ye, SEG'den SEJ'ye, SEL'den SEQ'ya ve SER'den SET'ye) ve stafilkokal enterotoksin benzeri toksinler (SEIK'den SEIQ'ya, SEIU'dan SEIX'e) olmak üzere 23'ten fazla stafilkokal enterotoksin tanımlanmıştır (Oliveria vd., 2018). Stafilkokal gıda zehirlenmelerinin yaklaşık % 95'ine SEA'dan SEE'ye stafilkokal enterotoksin tiplerinin neden olduğu bilinmektedir. Stafilkokal gıda zehirlenmelerinin geri kalan % 5'i yeni tanımlanmış diğer stafilkokal enterotoksinler ile ilişkilidir (Omoe vd., 2002).

Bu çalışmada Isparta ve Antalya illerinde perakende satışı yapılan 50 adet kanatlı (32 piliç, 9 hindi, 9 bildırcın) eti örneğinde *S. aureus* yaygınlığının araştırılması ve *S. aureus* izolatlarında antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında ayrıca *S. aureus* izolatlarında antibiyotik direnç genleri

(*mecA*, *blaZ*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *tekK*, *tetM*, *tetL*, *vanA* ve *vanB*) ve enterotoksin genleri (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) varlığı PZR ile araştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Kanatlı eti örnekleri

Çalışmada kullanılan toplam 50 adet kanatlı eti örnekleri (7 piliç kanat, 7 piliç baget, 4 piliç incik, 7 piliç göğüs, 7 piliç kelebek, 9 hindi boyun ve 9 bıldırcın) Antalya ve Isparta illerinde bulunan kasap ve marketlerden 2019 yılı Kasım-Haziran aylarını kapsayan 8 aylık dönemde temin edilmiştir.

Muhtemel *S. aureus* suşlarının izolasyonu

Muhtemel *S. aureus* suşlarının izolasyonu için kanatlı eti örnekleri aseptik koşullar altında steril bistüri kullanılarak küçük parçalara ayrılmış ve 10 g tartılarak steril blender (Waring Commercial 8011 ES, Torrington, CT, ABD) içerisinde 90 mL steril fizyolojik tuzlu su (% 0.85 NaCl, w/v) çözeltisi ilave edilerek yüksek devirde 1-1.5 dakika (dk) homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu ilk dilüsyonu takiben kanatlı eti örnekleri 10⁻³ seviyesine kadar dilüe edilmiştir. Her bir dilüsyondan mikropipet yardımıyla 0.1 mL alınarak aseptik koşullarda egg yolk tellurite (Acumedia LAB M) çözeltisi eklenmiş Baird Parker agar (BPA, Acumedia LAB M) besiyeri ortamına aktarılmış ve Drigalski spatülü ile yayma ekim yöntemi uygulanmıştır. Daha sonra Petri kutuları 37 °C'de 24-48 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda Petri kutularında gözlemlenen tipik *S. aureus* kolonileri (siyah merkezli ve etrafında çökelti halkası oluşan koloniler) muhtemel *S. aureus* izolatu olarak düşünülmüş ve öze yardımı ile alınarak BHI broth besiyeri ortamlarına aktarılmıştır. İzolatlar 37 °C'de 24 saat geliştirilerek kültüre edilmiştir. Seçilen izolatların saflık kontrolü BPA besiyerinde yapılmış ve saf olan kültürler steril gliserol (% 20, w/v) içeren tüplerde -20 °C'de stoklanmıştır.

Morfolojik tanı ve katalaz testi

Muhtemel *S. aureus* izolatlarının mikroskopik morfolojileri Gram boyama metodu ile hazırlanan preparatların ışık mikroskopunda (Soif, Türkiye)

incelenmesi ile belirlenmiştir (Temiz, 1994). Mikroskopik morfolojileri belirlenen izolatların katalaz testleri % 3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck, Darmstadt, Almanya) çözeltisi kullanılarak tespit edilmiştir (Temiz, 1994). Katalaz testinde pozitif (*S. aureus* ATCC 25923) ve negatif (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) kontrol olarak kullanılan referans suşlar Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu

Muhtemel *S. aureus* izolatlarından genomik DNA Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntem ile izole edilmiştir. Kısaca, 0.5 mL kültür Eppendorf tüplerine aktarılmış ve 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir (Sigma 2-16P, Rotor No: 12148, Almanya). Hücre çöktürleri 0.5 mL lizis çözeltisi ile çözülmüş ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda tüplere 30 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, % 10 w/v) ilave edilmiş ve 80 °C'de 5 dk tutulmuştur. Lize olan hücre süspansiyonları üzerine 0.7 mL fenol-kloroform (1:10) ilave edilmiş ve tüpler 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak yeni steril Eppendorf tüplerine aktarılmış, üzerine 0.7 mL soğuk 2-propanol (Merck) ilave edilmiş ve 13000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Çökelti 50 µL Tris-EDTA tamponu (pH 8.0) içerisinde çözülmüştür. Genomik DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Genomik DNA örneklerinin varlığı % 0.7 (w/v) agaroz (AppliChem GmbH., Darmstadt, Almanya) içerecek şekilde hazırlanan jellerde agaroz jel elektroforez yöntemi ile kontrol edilmiştir. Elektroforez işlemi OWL EASYCAST B2 (Thermo Fisher Scientific, ABD) yatay elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi, 85 voltta 1.5-2 saat süreyle yapılmıştır. Jel 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco, Solon, Ohio, ABD) içeren boya çözeltisinde 45 dk boyanmış ve süre sonunda 312 nm dalga boyunda ultraviyole ışık (Vilber Lourmat, ECX-F20.M, Fransa) altında incelenerek fotoğrafı çekilmiştir.

nuc geni varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılması

Muhtemel *S. aureus* izolatlarının tür düzeyinde tanısı *S. aureus*'da termostabil nükleaz genine (*nuc*) özgü 458 bp büyüklüğünde fragment veren NUC1 (5'-ATGAAGTCAATAAATCGCT-3') ve NUC2 (5'-TTTGGTGAAAAATACTTCTC-3') primerleri kullanılarak TurboCycler 2 (Blue-Ray Biotech Ltd., Tayvan) gradient termal döngü cihazı kullanılarak yapılmıştır. PZR işlemi toplam 50 µL PZR karışımı (25 µL 2x PCR master miks (Thermo #K0171, Litvanya), 20 µL nükleaz içermeyen su, 3 µL kalıp DNA, 1 µL ileri primer ve 1 µL geri primer) kullanılarak 1 döngü başlangıç denatürasyonu (94 °C'de 2 dk), 40 döngü çoğalma (94 °C'de 2 dk, 55 °C'de 2 dk, 72 °C'de 3 dk) ve 1 döngü son uzama (72 °C'de 10 dk) aşamalarından oluşan protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Gandra vd., 2011). Çoğaltılan PZR fragmentlerinin elektroforezi OWL EASYCAST B2 yatay elektroforez tankında % 2 (w/v) oranında agaroz içeren jellerde 85 voltta 1.5-2 saat süre ile yapılmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında Genesta™ 100-bp DNA marker (GeneAll, Kore) moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. Jeller etidyum bromit (Amresco) içeren çözeltide boyanmış ve UV transilluminatör üzerinde (Vilber Lourmat) görüntülenmiştir.

Koagülaz testi

S. aureus kolonilerinin koagülaz aktivitesi Oxoid Staphylase (DR0595A) test kiti (Oxoid Ltd., Basingstoke, İngiltere) kullanılarak üretici firma tarafından önerilen yöntemle göre test edilmiştir. Koagülaz testinde Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilen *S. aureus* ATCC 29213 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Antibiyotik direnç

S. aureus suşlarının antibiyotik direnç profili Oxoid Ltd. Şti. (İngiltere)'den temin edilen amikasin (30 µg), doksisisiklin (30 µg), eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), kanamisin (30 µg), kinupristin-dalfopristin (15 µg), kloramfenikol (30 µg), linezolid (30 µg), minosiklin (30 µg), penisilin G (10 U), rifampin (5 µg), sefoksitin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), teikoplanin (30 µg), tetrasiklin (30 µg) ve trimetoprim/

sulfametoksazol (30 µg) ticari antibiyotik diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Cariolato vd., 2008; Yogurtcu ve Tuncer, 2013). Sonuçlar Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Standards Institute, CLSI) 2016 kılavuzuna göre değerlendirilmiştir.

Antibiyotik direnç genlerinin tespiti

S. aureus izolatlarında oksasilin (*mecA*), penisilin (*blaZ*), gentamisin (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*), streptomisin (*aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*), eritromisin (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*), tetrasiklin (*tetK*, *tetM*, *tetL*) ve vankomisin (*vanA*, *vanB*) direnç genlerinin varlığı Çizelge 1'de verilen primer çiftleri kullanılarak PZR ile araştırılmıştır.

PZR protokolleri *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* ve *aph(2'')-Id* genleri için 1 döngü 94 °C'de 3 dk, 40 döngü 94 °C'de 40 saniye (sn), 55 °C'de 40 sn, 72 °C'de 40 sn ve 1 döngü 72 °C'de 2 dk; *ant(6')-Ia* geni için 1 döngü 94 °C'de 3 dk, 40 döngü 94 °C'de 30 sn, 56 °C'de 30 sn, 72 °C'de 1 dk ve 1 döngü 72 °C'de 5 dk; *tetK*, *tetM*, *tetL*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *vanA* ve *vanB* genleri için 1 döngü 94 °C'de 2 dk, 30 döngü 94 °C'de 60 sn, uygun sıcaklıkta 60 sn (*tetL*, *vanA* ve *vanB* genleri için 54 °C, *ermA* ve *tetK* genleri için 55 °C, *tetM* geni için 45 °C; *ermB* geni için 52 °C, *ermC* geni için 48 °C), 72 °C'de 1 dk ve 1 döngü 72 °C'de 10 dk; *blaZ* geni için 1 döngü 94 °C'de 4 dk, 40 döngü 94 °C'de 30 sn, 55 °C'de 30 sn, 72 °C'de 1 dk ve 1 döngü 72 °C'de 5 dk; *mecA* geni için 1 döngü 94 °C'de 5 dk, 30 döngü 94 °C'de 60 sn, 50 °C'de 60 sn, 72 °C'de 2 dk ve 1 döngü 72 °C'de 10 dk ve *msrA* ve *msrB* genleri için ise 1 döngü 94 °C'de 10 dk, 25 döngü 94 °C'de 60 sn, 50 °C'de 60 sn, 72 °C'de 1.5 dk ve 1 döngü 72 °C'de 10 dk olarak uygulanmıştır (Dutka-Malen vd., 1995; Lina vd., 1999; Martineau vd., 2000; Depardieu vd., 2004; Zhang vd., 2004; Vakulenko vd., 2003; Ouoba vd., 2008 ve Niu vd., 2016). PZR denemelerinde *E. faecium* FYE41 (*ermC*⁺, *tetM*⁺, *tetL*⁺), *E. gallinarum* DYE45 (*ermA*⁺, *ermB*⁺, *tetM*⁺, *tetL*⁺), *E. faecium* ATCC 51559 (*vanA*⁺), *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanB*⁺) ve *S. aureus* ATCC 43300 (*mecA*⁺) suşları pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çizelge 1. Antibiyotik direnç ve enterotoksin genlerinin tespitinde kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri

Table 1. Primers for detection of antibiotic resistance and enterotoxin genes and product sizes

Gen Gene	Primer dizileri (5'-3') Primer sequences (5'-3')	Ürün büyüklüğü (bp) Product size (bp)	Kaynak Reference
<i>mecA</i>	GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAA	310	Zhang vd., 2004
<i>blaZ</i>	ACTTCAACACCTGCTGCTTTC TGACCACCTTTTATCAGCAACC	173	Martineau vd., 2000
<i>aac(6')-Ie</i>	CAGGAATTTTATCGAAAAATGGTAGAAAAG	369	Vakulenko vd., 2003
<i>-aph(2'')-Ia</i>	CACAATCGACTAAAGAGTACCAATC		
<i>aph(2'')-Ib</i>	CTTGGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	867	Vakulenko vd., 2003
<i>aph(2'')-Ic</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	444	Vakulenko vd., 2003
<i>aph(2'')-Id</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	641	Vakulenko vd., 2003
<i>aph(3')-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATAACAGCTCGCG	523	Vakulenko vd., 2003
<i>ant(4')-Ia</i>	CAAACCTGCTAAATCGGTAGAAGCC GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT	294	Vakulenko vd., 2003
<i>ant(6')-Ia</i>	ACTGGCTTAATCAATTTGGG GCCTTTCCGCCACCTCACCG	577	Niu vd., 2016
<i>ermA</i>	AAGCGGTAAACCCCTCTGA TTCGCAAATCCCTTCTCAAC	190	Martineau vd., 2000
<i>ermB</i>	CTATCTGATTTGTTGAAGAAGGATF GTTTACTCTTTGGTTTAGGATGAAA	142	Martineau vd., 2000
<i>ermC</i>	AATCGTCAAATTCCTGCATGT TAATCGTGGAAATACGGGTTTG	299	Martineau vd., 2000
<i>msrA</i>	TCCAATCATTCACAAAATC AATTCCTCTATTTGGTGGT	163	Martineau vd., 2000
<i>msrB</i>	TATGATATCCATAATAATTATCCAATC AAGTTATATCATGAATAGATTGTCTGTT	595	Lina vd., 1999
<i>tetK</i>	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	718	Ouoba vd., 2008
<i>tetM</i>	GTTAAATAGTGTTCCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	657	Ouoba vd., 2008
<i>tetL</i>	GTTGCGCGCTATATTCCAAA TTAAGCAAACCTCATTCCAGC	788	Ouoba vd., 2008
<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732	Dutka-Malen vd., 1995
<i>vanB</i>	ACGGAATGGGAAGCCGA TGCACCCGATTTTCGTTT	647	Depardieu vd., 2004
<i>sea</i>	CCTTTGGAAACGGTTAAAACG TCTGAACCTTCCCATCAAAAAC	127	Omeo vd., 2005
<i>seb</i>	TGCATCAAACCTGACAAAACG GCAGGTACTCTATAAAGTGCCTGC	477	Omeo vd., 2005
<i>sec</i>	CTCAAGAACTAGACATAAAAAGCTAGG TCAAAAATCGGATTAACATATCC	271	Omeo vd., 2005
<i>sed</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAAACG TTAATGCTATATCTTATAGGGTAAACATC	319	Omeo vd., 2005
<i>see</i>	CAGTACCTATAGATAAAGTTAAAACAAGC TAACCTACCGTGGACCCTTC	178	Omeo vd., 2005

Çoğaltılan PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi OWL EASYCAST B2 yatay elektroforez tankında % 2 (w/v) oranında agaroz içeren jellerde 85 voltta 1.5-2 saat süre ile yapılmıştır. Fragment büyüklüklerinin hesaplanmasında Genesta™ 100-bp DNA marker (GeneAll, Kore) moleküler belirteç olarak kullanılmıştır. Jeller 0.2 µg/mL etidyum bromit (Amresco) içeren çözelti içerisinde 30 dk boyanmış ve UV transilluminatör üzerinde (Vilber Lourmat) görüntülenmiştir. Jel fotoğrafları Nikon D5100 (Nikon Corp.) dijital fotoğraf makinesi kullanılarak çekilmiştir.

Enterotoksin genlerinin tespiti

S. aureus izolatlarında SEA, SEB, SEC, SED ve SEE enterotoksinlerinin genetik determinantlarının (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) varlığı Çizelge 1'de verilen primer çiftleri kullanılarak TurboCycler 2 (Tayvan) gradient termal döngü cihazında multipleks-PZR (mPZR) yöntemi ile araştırılmıştır. mPZR işlemi toplam 20 µL PZR karışımı (10 µL Phusion Flash High-Fidelity PCR master miks (Thermo #F-548L, Litvanya), 3.5 µL nükleaz içermeyen su, 5 µL primer takımı ve 1.5 µL kalıp DNA) kullanılarak 1 döngü başlangıç denatürasyonu (95 °C'de 120 sn), 35 döngü çoğalma (95 °C'de 30 sn, 57 °C'de 90 sn, 72 °C'de 90 sn) ve 1 döngü son uzama (72 °C'de 10 dk) aşamalarından oluşan PZR protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Omeo vd., 2005). Çoğaltılan enterotoksin genlerinin PZR fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi % 2 (w/v) agaroz oranı ile hazırlanan jellerde yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

S. aureus izolasyonunda kullanılan 50 adet kanatlı eti örneğinden toplam 158 muhtemel *S. aureus* suşu izole edilmiştir. Muhtemel *S. aureus* olduğu düşünülen 158 adet izolatın izole edildiği örnek türü, temin edildiği iller ve izolat kodları Çizelge 2'de verilmiştir. Gram boyama ve katalaz testi sonucu 158 adet izolattan 130 adedinin Gram pozitif kok (tekli ve düzensiz kümeler) morfolojisinde ve katalaz pozitif özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu 130 izolat muhtemel *S. aureus* olabileceği düşünülerek çalışma materyali olarak seçilmiştir. *S. aureus* Gram pozitif ve katalaz pozitif özellik gösteren bakteridir. Kok

morfolojisine sahip olan bu bakterinin mikroskopik morfolojisi sıvı besiyeri ortamında kültüre edildiklerinde tekli ve düzensiz kümeler halinde görülmektedir (Schein vd., 2011). Diğer taraftan Gram negatif ve katalaz negatif özellik gösteren 28 izolat (S2, S9, S14, S15, S16, S17, S18, S25, S36, S37, S50, S51, S55-2, S57, S58, S59, S62, S65, S66, S67, S68, S73, S90, S99, S120, S121, S124, S125) ise *Staphylococcus* cinsinin genel özellikleri ile uyum göstermemesi nedeni ile çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

Çalışma kapsamında izole edilen 130 muhtemel *S. aureus* izolatının tür düzeyinde tanısı *S. aureus*'a özgü termostabil nükleaz geni (*nuc*) varlığının PZR ile araştırılması ile yapılmıştır. Cancilla vd. (1992) tarafından önerilen yöntemle göre izole edilen genomik DNA örneklerinin varlığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir (Veri gösterilmedi). Ekstraselüler termostabil nükleaz (TNaz) *S. aureus* tarafından üretilen hem DNA hem de RNA'yı kesme özelliğine sahip bir enzimdir. TNaz aktivitesi *S. aureus*'a özgül olmasa da bu enzimi kodlayan *nuc* geninde yer alan *S. aureus* türüne özgül diziler nedeni ile bu gen *S. aureus*'un tanısında moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır (Brakstad vd., 1992). Genomik DNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı PZR uygulaması sonucu 130 adet izolattan 16 adedinde (S3, S7, S11, S12, S19, S30, S31, S32, S33, S34, S39, S41, S42, S82, S96 ve S118) *nuc* genine özgü 458 bp büyüklüğünde ampikonlar elde edilmiştir (Şekil 1). Elde edilen bu bulgular ışığında S3, S7, S11, S12, S19, S30, S31, S32, S33, S34, S39, S41, S42, S82, S96 ve S118 kodlu izolatlar *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Baird Parker agarda *S. warneri* ve *Proteus penneri* türleri *S. aureus* ile benzer koloni morfolojisine sahiptir (Abolghait vd., 2020). Bu nedenle çalışma kapsamında *nuc* genine özgül primer çifti ile ampikon vermeyen izolatların *S. warneri* veya *P. penneri* türleri olabileceği düşünülmektedir. Bu izolatların tür düzeyinde kesin tanısının 16S rDNA dizi analizi ile yapılması gerekmektedir. Bu çalışmaya benzer olarak geçmiş yıllarda yapılan pek çok çalışmada da *S. aureus*'un tanısında *nuc* genini hedef alan primer çiftleri sıklıkla kullanılmıştır (Karmakar vd., 2016; Sırıken vd., 2018; Kadiroğlu vd., 2019; Sadiq vd., 2020).

Çizelge 2. Muhtemel *S. aureus* izolasyonunda kullanılan örnek türü, örneğin temin edildiği il ve izolat kodları

Table 2. Sample type used in presumptive *S. aureus* isolation, province from which the sample was provided and isolate codes

Örnek türü Sample type	Temin edildiği il Provided province		İzolat kodları Isolate codes
	Antalya	Isparta	
Piliç kanat (n= 7) (Chicken wing)	2	5	S1, S2, S3, S10, S11, S12, S13, S14, S25, S26, S34, S63, S64, S70, S71, S147, S148, S156, S157
Piliç baget (n= 7) (Chicken drumstick)	2	5	S16, S17, S27, S28, S29, S30, S31, S32, S33, S35, S49, S50, S51, S52, S53, S54, S66, S67, S68, S69, S83, S92, S93, S152, S153
Piliç sarma (n= 4) (Chicken shank)	1	3	S4, S5, S6, S22, S23, S24, S39, S40, S41, S42, S43, S44, S48, S82, S149
Piliç göğüs (n= 7) (Chicken breast)	4	3	S7, S8, S9, S18, S19, S20, S21, S38, S60, S61, S62, S72, S73, S74, S75, S76, S80, S81, S145
Piliç kelebek (n= 7) (Chicken butterfly)	5	2	S15, S36, S37, S38, S45, S46, S47, S55-1, S55-2, S56, S57, S58, S59, S65, S77, S78, S79, S84, S85, S95, S154, S155
Hindi boyun (n= 9) (Turkey neck)	0	9	S86, S87, S88, S89, S90, S91, S94, S96, S97, S98, S99, S100, S101, S102
Bıldırcın (n= 9) (Quail)	0	9	S103, S104, S105, S106, S107, S108, S109, S110, S111, S112, S113, S114, S115, S116, S117, S118, S119, S120, S121, S122, S123, S124, S125, S126, S127, S130, S131, S132, S133, S134, S135, S136, S137, S138, S139, S140, S141, S142, S143, S144, S146, S147, S150, S151

n: örnek sayısı / number of sample



Şekil 1. Muhtemel *S. aureus* izolatlarında *nuc* geni varlığının PZR ile tespiti

1: S1; 2: S3; 3: S4; 4: S7; 5: S8; 6: S10; 7: S11; 8: S12; 9: S27; 10: Genesta™ 100 bç DNA marker (GeneAll, Korea); 11: S34; 12: S40; 13: S41; 14: *S. aureus* ATCC 25923 (pozitif kontrol) ; 15: negatif kontrol (su)

Figure 1. Detection of *nuc* gene presence in presumptive *S. aureus* isolates by PCR

1: S1; 2: S3; 3: S4; 4: S7; 5: S8; 6: S10; 7: S11; 8: S12; 9: S27; 10: Genesta™ 100 bp DNA marker (GeneAll, Korea); 11: S34; 12: S40; 13: S41; 14: *S. aureus* ATCC 25923 (positive control) ; 15: negative control (water)

İzolatlarda *nuc* geni varlığının PZR ile araştırıldığı denemelerden elde edilen bulgular sonucunda çalışma kapsamında izolasyon materyali olarak kullanılan 50 adet kanatlı eti örneğinin 10 adedinden *S. aureus* izole edildiği belirlenmiştir. Kanatlı eti örneklerinde *S. aureus* izolasyon sıklığı % 20 olarak hesaplanmıştır. İzole edilen 16 adet *S. aureus* suşunun 14 adedi (14/16, % 87.5) piliç eti örneklerinden, 1'er adedi (1/16, % 6.25) ise bıldırcın ve hindi boyun örneklerinden izole edilmiştir. Bu çalışmada kanatlı eti örneklerinde tespit edilen *S. aureus* izolasyon sıklığına benzer olarak ABD'de yapılan bir çalışmada 45 piliç eti örneğinin % 18.2'sinde ve 36 hindi örneğinin % 19.4'ünde *S. aureus* varlığı saptanmıştır (Hanson vd., 2011). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda ise kanatlı eti örneklerinde *S. aureus* bulunma sıklığı bu çalışmada bulunan değerden yüksek bulunmuştur (Kitia vd., 2005; Kaya vd., 2015; Özdemir ve Keyvan, 2016). Çalışma kapsamında izole edilen *S. aureus* suşlarının tamamı Isparta ilinde satışı yapılan örneklerden izole edilmiştir. Antalya ilinden temin edilen örneklerin hiçbirinden *S. aureus* suşu izole edilmemiştir. Bu durumun iki il arasında toplanan örnek sayısı farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ancak ette *S. aureus* tespiti, genellikle üretim sürecine dahil olan bireyler tarafından işleme, nakliye, dilimleme, depolama ve satış noktası sırasındaki zayıf hijyenik uygulamalarla ilgilidir (Sadiq vd., 2020). Bu nedenle *S. aureus* izolatlarının yalnız Isparta ilinden temin edilen örneklerden çıkması kanatlı etlerinin işlenmesi sırasında kullanılan aletlerin veya işleyen kişilerin *S. aureus* taşıyıcısı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Koagülaz testi *S. aureus*'un diğer stafilocok türlerinden ayırımında kullanılan kolay bir yöntemdir (Kaçmaz vd., 2015). Rutin laboratuvar uygulamalarında *S. aureus*'un diğer stafilocoklardan ayırımında koagülaz üretimi sıklıkla tek kriter olarak kullanılmaktadır. Ancak *S. aureus* dışında koagülaz pozitif stafilocokların da olduğu göz ardı edilmemelidir (Anonymous, 2020). Bunun yanı sıra geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda koagülaz negatif *S. aureus* suşlarının da olduğu rapor edilmiştir (Vandenesch vd., 1994; Olwer vd., 2004; Bayston vd., 2006). Bu nedenle

bu çalışma kapsamında koagülaz testi izolatların *nuc* geni varlığının araştırılmasından sonra yapılmıştır. PZR sonucu *nuc* geni varlığı belirlenen suşların koagülaz aktivitesi incelenmiş ve *nuc^t* izolatların tamamının aynı zamanda koagülaz pozitif özellikte olduğu belirlenmiştir.

Disk difüzyon testi sonucu, *S. aureus* izolatlarının tamamının (% 100) en az bir antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Benzer olarak Wang vd. (2017) Çin'de 203 şehirden temin ettikleri 27000 gıda örneğinden (4500'ü kanatlı eti) izole ettikleri 1150 *S. aureus* izolatının % 97.6'sının (1122/1150) en az bir antibiyotiğe karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Çin'de yapılan bir başka çalışmada da perakende satışı yapılan kanatlı eti ve ürünlerinin de içinde yer aldığı 1850 et ve et ürününden izole edilen 868 *S. aureus* izolatından yalnız 11'inin çalışmada kullanılan 24 antibiyotiğin tamamına duyarlı olduğu, izolatların % 94.6'sının ise 3 veya daha fazla antibiyotiğe dirençli veya orta seviyede dirençli olduğu belirlenmiştir (Wu vd., 2018).

Kanatlı eti örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık ve direnç yüzdeleri Çizelge 4'de verilmiştir. *S. aureus* izolatlarının tamamının (% 100) kloramfenikole ve teikoplanine duyarlı olduğu belirlenmiştir. İzolatların kloramfenikol ve teikoplaninden sonra en duyarlı olduğu antibiyotiklerin % 93.75 ile (15/16) doksisisiklin, linezolid ve tetrasiklin olduğu belirlenmiştir. Bu antibiyotikleri % 81.25 (13/16) ile minosiklin, % 68.75 (11/16) ile rifampin, % 62.5 (10/16) ile amikasin ve % 56.25 (9/16) ile gentamisin, kanamisin ve siprofloksasin antibiyotikleri izlemektedir. Çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklere karşı ise izolatların daha düşük düzeyde duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgulara benzer olarak Wu vd. (2018) et ve et ürünlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının linezolid (% 0.6), teikoplanin (% 0.9), amikasin (% 7.5) ve rifampin (% 9.3) direnç düzeylerinin düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Çizelge 3. *S. aureus* suşlarının antibiyotik direnç profilleri ve antibiyotik direnç genleri
Table 3. Antibiotic resistance profiles and antibiotic resistance genes in *S. aureus* strains

Suşlar <i>Strains</i>	Antibiyotik direnç* <i>Antibiotic resistance*</i>	Antibiyotik direnç genleri <i>Antibiotic resistance genes</i>
<i>S. aureus</i> S3	AK, P, FOX, SXT, QD	-
<i>S. aureus</i> S7	CN, P, FOX, SXT	<i>tetK</i>
<i>S. aureus</i> S11	P	<i>blaZ</i>
<i>S. aureus</i> S12	P	<i>blaZ, msrA, msrB, tetK</i>
<i>S. aureus</i> S19	P	<i>blaZ, tetK</i>
<i>S. aureus</i> S30	E, KA, P, FOX, SXT, QD, RD	<i>ant(6')-Ia</i>
<i>S. aureus</i> S31	P, FOX, QD	<i>blaZ</i>
<i>S. aureus</i> S32	AK, LZD, P, FOX, QD, RD, CIP	<i>blaZ</i>
<i>S. aureus</i> S33	P, FOX	<i>blaZ</i>
<i>S. aureus</i> S34	P, FOX, SXT	-
<i>S. aureus</i> S39	AK, KA, MH, P, FOX, SXT, CIP	<i>blaZ, aph(3')-IIIa</i>
<i>S. aureus</i> S41	E, P, FOX, SXT	<i>blaZ</i>
<i>S. aureus</i> S42	CN, P, FOX, SXT, TE	<i>blaZ, tetK</i>
<i>S. aureus</i> S82	E, KA, P, FOX, SXT, QD, RD	<i>ant(6')-Ia</i>
<i>S. aureus</i> S96	E, KA, P, FOX, SXT, QD, CIP	-
<i>S. aureus</i> S118	AK, E, CN, P, FOX, SXT, QD	<i>mecA, blaZ, tetL</i>

*AK: Amikasin/*Amikacin* (30 µg); DO: Doksisisiklin/*Doxycycline* (30 µg); E: Eritromisin/*Erythromycin* (15 µg); CN: Gentamisin/*Gentamicin* (10 µg); C: Kloramfenikol/*Chloramphenicol* (30 µg); KA: Kanamisin/*Kanamycin* (30 µg); LZD: Linezolid/*Linezolid* (30 µg); MH: Minosiklin/*Minocycline* (30 µg); P: Penisilin G/*Penicillin G* (10 U); FOX: Sefoksitin/*Cefoxitin* (30 µg); SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol/*Trimethoprim/sulfamethoxazole* (30 µg); QD: Quinupristin/dalfopristin/*Quinupristin/dalfopristin* (15 µg); RD: Rifampin/*Rifampin* (5 µg); CIP: Siprofloksasin/*Ciprofloxacin* (5 µg); TEC: Teikoplanin/*Teicoplanin* (30 µg) ve TE: Tetrasiklin/*Tetracycline* (30 µg)

Çizelge 4. *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık ve direnç yüzdeleri (%)
Table 4. Antibiotic susceptibility and resistance percentages (%) of *S. aureus* isolates

Antibiyotikler <i>Antibiotics</i>	S*		I		R	
	<i>n</i> **	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Amikasin (<i>Amikacin</i>)	10	62.5	2	12.5	4	25
Doksisisiklin (<i>Doxycycline</i>)	15	93.75	1	6.25	0	0
Eritromisin (<i>Erythromycin</i>)	6	37.5	5	31.25	5	31.25
Gentamisin (<i>Gentamicin</i>)	9	56.25	4	25	3	18.75
Kloramfenikol (<i>Chloramphenicol</i>)	16	100	0	0	0	0
Kanamisin (<i>Kanamycin</i>)	9	56.25	3	18.75	4	25
Linezolid (<i>Linezolid</i>)	15	93.75	0	0	1	6.25
Minosiklin (<i>Minocycline</i>)	13	81.25	2	12.5	1	6.25
Penisilin G (<i>Penicillin G</i>)	0	0	0	0	16	100
Sefoksitin (<i>Cefoxitin</i>)	3	18.75	0	0	13	81.25
Trimetoprim/sulfametoksazol (<i>Trimethoprim/sulfamethoxazole</i>)	5	31.25	1	6.25	10	62.5
Quinupristin/dalfopristin (<i>Quinupristin/dalfopristin</i>)	6	37.5	3	18.75	7	43.75
Rifampin (<i>Rifampin</i>)	11	68.75	2	12.5	3	18.75
Siprofloksasin (<i>Ciprofloxacin</i>)	9	56.25	4	25	3	18.75
Teikoplanin (<i>Teicoplanin</i>)	16	100	0	0	0	0
Tetrasiklin (<i>Tetracycline</i>)	15	93.75	0	0	1	6.25

*S: Duyarlı/*Susceptible*; I: Orta seviyede dirençli/*Intermediary*; R: Dirençli/*Resistant*

***n*: izolat sayısı / *number of isolate*

Çalışma kapsamında kanatlı eti örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının tamamının (% 100) penisilin G'ye dirençli olduğu tespit edilmiştir. Penisilin G dışında izolatların % 81.25'inin (13/16) sefoksitine, % 62.5'inin (10/16) trimetoprim/sulfametoksazole, % 43.75'inin (7/16) quinupristin/dalfopristine ve % 31.25'inin (5/16) eritromisine dirençli olduğu belirlenmiştir. İzolatlarda amikasin, kanamisin, gentamisin, rifampin, siprofloksasin, linezolid, minosiklin ve tetrasiklin direncinin ise düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4). Elde edilen bulgulara benzer olarak Wang vd. (2017) 1150 *S. aureus* izolatının en çok (% 83.7, 963/1150) penisiline dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak diğer taraftan araştırmacılar bu çalışmada elde edilenden daha yüksek oranda linezolid (% 67.7, 778/1150) ve tetrasiklin (% 38.2, 439/1150) direnci belirlemişlerdir. Wu vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada da et ve et ürünlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında yüksek oranda (% 84.6) penisilin direnci tespit edilmiştir. Sefoksitin disk difüzyon testi MRSA'ların tespitinde fenotipik marker olarak kullanılmaktadır (Annad vd., 2009; Abolghait vd., 2020; Sadiq vd., 2020). Bu bilgi ışığında sefoksitine dirençli olduğu tespit edilen *S. aureus* izolatları (% 81.25'i, 13/16) MRSA olarak tanımlanmıştır. Sadiq vd. (2020) mezbahe ve et satışı yapılan dükkanlardan temin ettikleri tavuk örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının % 63'ünün (19/25) sefoksitine dirençli olduğunu belirlemiş ve bu suşları MRSA olarak tanımlamışlardır. Çalışma kapsamında kanatlı eti örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşları arasında yüksek oranda MRSA tanımlanması tüketici sağlığı açısından endişe uyandırmaktadır.

S. aureus suşlarında *mecA*, *blaZ*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *ant(6')-Ia*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *tetK*, *tetM*, *tetL*, *vanA* ve *vanB* direnç genlerinin varlığı spesifik primerler kullanılarak PZR ile araştırılmış ve elde edilen bulgular Çizelge 3'de verilmiştir. *S. aureus* izolatları arasında S3, S34 ve S96 suşları dışında kalan izolatlarda en az bir antibiyotik direnç geni varlığı tespit edilmiştir. *S. aureus* S12 (*blaZ*, *msrA*, *msrB*, *tetK*), S118 (*mecA*, *blaZ*, *tetL*), S19 (*blaZ*, *tetK*), S39 (*blaZ*, *aph(3')-IIIa*) ve S42 (*blaZ*, *tetK*) suşlarında ise birden fazla

antibiyotik direnç geni varlığı belirlenmiştir (Çizelge 3).

PZR işlemi sonucu *S. aureus* suşlarında % 62.5 ile (10/16) en sık rastlanan genin *blaZ* olduğu tespit edilmiştir. Stafilokoklarda penisilin direnci *blaZ* ve *mecA* genleri üzerinde kodlu iki mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalardan en önemlisi β -laktamaz üretimidir (Olsen vd., 2006) Kromozom veya plazmid üzerinde yer alabilen *blaZ* geni tarafından kodlanan β -laktamaz enzimi, β -laktam halkasını hidrolize ederek stafilokoklarda penisilin direncine neden olmaktadır (Olsen vd., 2006; Bacigil vd., 2012; Takayama vd., 2015; Pal vd., 2020). İkinci mekanizmada ise *mecA* geninde kodlu penisilin bağlayıcı protein PBP2a kaynaklıdır (Olsen vd., 2006; Pal vd., 2020). *blaZ* geni PZR sonuçları, antibiyotik disk difüzyon testi sonuçlarını genel anlamda destekler nitelikte bulunmuştur. Ancak, disk difüzyon testi sonucu fenotipik olarak penisiline dirençli olan S3, S7, S30, S34, S82 ve S96 kodlu izolatlarda *blaZ* geni tespit edilmemiştir. Benzer olarak geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda da fenotipik olarak penisiline dirençli stafilokok suşlarında *blaZ* geni bulunmadığı bildirilmiştir (Frey vd., 2013; Yang vd., 2015). Fenotipik olarak penisiline dirençli ancak *blaZ* geni içermeyen bu suşlarda penisilin direnci nokta mutasyonlardan veya başka bir direnç mekanizmasından kaynaklanıyor olabilir. *blaZ* geni dışında izolatların % 25'inde (4/16) *tetK*, % 12.5'inde (2/16) *ant(6')-Ia* ve % 6.25'inde (1/16) *mecA*, *aph(3')-IIIa*, *msrA*, *msrB* ve *tetL* geni varlığı tespit edilmiştir. İzolatların hiçbirinde *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *ant(4')-Ia*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetM*, *vanA* ve *vanB* geni varlığı tespit edilmemiştir (Çizelge 3).

Tetrasiklin direnç genleri *tetK* ve *tetL* membran ile ilişkili ATP-bağımlı efluks proteinleri kodlamaktadırlar. Bu proteinler tetrasiklinin hücre içerisinde birikmesini önleyerek hücreye direnç kazandırmaktadırlar. *tetM* geni ise ribozomal koruma proteini kodlayarak tetrasiklinin ribozoma olan ilgisini azaltmaktadır (Ullah vd., 2012). Çalışma kapsamında *S. aureus* suşlarında en yaygın karşılaşılan tetrasiklin direnç geninin *tetK* olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak son yıllarda

farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da stafilokoklarda tetrasiklin direncine yaygın olarak *tetK* geninin aracılık ettiği belirlenmiştir (Ullah vd., 2012; Pyzik vd., 2019).

Aminoglikozid modifiye edici enzim kodlayan *ant(6')-Ia* geni *S. aureus* S30 ve S82 suşlarında, *aph(3')-IIIa* geni ise *S. aureus* S39 suşunda tespit edilmiştir. Stafilokoklarda *ant(6')-Ia* geni tarafından kodlanan aminoglikozid nkleotidiltransferaz enzimi streptomisin (Hauschild vd., 2008), *aph(3')-IIIa* geni tarafından kodlanan aminoglikozid fosfotransferaz enzimi ise amikasin, neomisin ve kanamisin direncine neden olmaktadır (Woegerbauer vd., 2014). Çalışma kapsamında da *aph(3')-IIIa* geni içeren *S. aureus* S39 suşunun amikasin ve kanamisine dirençli olduğu belirlenmiştir.

mecA geni stafilokoklarda oldukça korunmuş bir gen olup metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının genotipik olarak belirlenmesinde potansiyel biyomarker olarak kullanılmaktadır (Sadiq vd., 2020). Çalışma kapsamında fenotipik olarak metisiline dirençli olduğu tespit edilen 13 izolattan yalnız *S. aureus* S118 suşunda *mecA* geni varlığı tespit edilmiştir. Bu durum söz konusu suşlarda modifiye doğal (intrinsic) penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) retimi ile metisilin affinitesindeki değişim (Tomasz vd., 1989) veya arttırılmış β -laktamaz üretimi ile metisilin inaktive edilmesinden kaynaklanıyor olabilir (Swenson vd., 2002). Elde edilen bu bulgulara benzer olarak Asfour ve Darwish (2011) tarafından yapılan çalışmada da fenotipik olarak sefoksitin dirençli 43 stafilokok izolatının 27'sinde *mecA* geni varlığı tespit edilmiştir. Wang vd. (2017) tarafından yapılan çalışmada ise fenotipik olarak sefoksitine dirençli 111 *S. aureus* izolatının 91'inde *mecA* geni tespit edilmiştir. Diğer taraftan bu bulguların aksine farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda fenotipik olarak sefoksitine (30 μ g) dirençli *S. aureus* suşlarının tamamında *mecA* geni varlığı gösterilmiştir (Anand vd., 2009; Karmakar vd., 2016; Wu vd., 2018; Wu vd., 2019; Abolghait vd., 2020).

Çalışma kapsamında yalnız fenotipik olarak orta seviyede eritromisine dirençli *S. aureus* S12

suşunda *msrA* ve *msrB* genleri tespit edilmiştir. Fenotipik olarak eritromisine dirençli bulunan *S. aureus* S30, S41, S82, S96 ve S118 izolatlarında ise eritromisin direnç geni varlığı tespit edilmemiştir. Stafilokoklarda eritromisin direnci genellikle diğer makrolidlere direnç ile ilişkilidir (Pyzik vd., 2019). *erm* genleri kodladıkları metiltransferaz enzimleri ile stafilokoklarda ribozomal hedef bölgenin modifikasyonu yolu ile makrolidlere, linkozamidlere ve tip B streptograminlere dirence neden olmaktadır (Reyes vd., 2007; Pyzik vd., 2019). *msrA* ve *msrB* genleri ise ATP-bağımlı efluks pompası kodlayarak indüklenebilir eritromisin direncine neden olmaktadır (Pyzik vd., 2019; Pal vd., 2020).

Kanatlı eti örneklerinden izole edilen 16 adet *S. aureus* suşunda *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* enterotoksin geni varlığı mPZR yöntemi ile araştırılmıştır. mPZR denemeleri sonucunda *S. aureus* suşlarının hiçbirinde *sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see* geni varlığı tespit edilmemiştir. Bu bulguların aksine ülkemizde ve yurt dışında farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda kanatlı eti örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının farklı düzeylerde de olsa enterotoksin geni içerdiği belirlenmiştir (Gencay vd., 2010; zdemir ve Keyvan, 2016; Wang vd., 2017; Saad vd., 2018; Abolghait vd., 2020). Çalışma kapsamında kanatlı eti örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında klasik enterotoksin genlerinin (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* ve *see*) tespit edilmemiş olması tüketicici sağlığı açısından bir avantajdır. Ancak söz konusu suşlarda diğer enterotoksin genlerinin varlığının da araştırılması gerekmektedir.

SONUÇ

S. aureus insanlarda hem gıda zehirlenmesine hem de önemli enfeksiyonlara yol açtığı bilinen bir patojendir. Çalışma kapsamında 50 kanatlı eti örneğinden 16 *S. aureus* suşu izole edilmiştir. *S. aureus* izolatlarının tamamı penisilin G'ye dirençli bulunmuş ve % 81.25'inin MRSA olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarda en sık rastlanan antibiyotik direnç geninin *blaZ* olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan izolatların hiçbirinde klasik enterotoksin genleri varlığına rastlanılmamıştır. Yapılan alışma tüketicici sağlığı açısından mevcut riski ortaya koyması açısından önem taşımaktadır. Kanatlı

etlerinden izole edilen *S. aureus* suşları arasında yüksek oranda MRSA izolatlarına rastlanmıştır olması endişe uyandırıcıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı FYL-2019-6994 nolu proje ile maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederiz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarların, başka kişiler ve/veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

YT, çalışma konusunu belirlemiş ve deneysel çalışma düzenini planlamıştır. ÇK ve YT deneysel çalışmaları gerçekleştirmiştir. ÇK makalenin taslağını oluşturmuş, YT makalenin son halini almasını sağlamıştır. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

KAYNAKLAR

Abolghait, S.K., Fathi, A.G., Youssef, F.M., Algammal, A.M. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from chicken meat and giblets often produces staphylococcal enterotoxin B (SEB) in non-refrigerated raw chicken livers. *Int J Food Microbiol*, 328: 1-9.

Anand, K.B., Agrawal, P., Kummar S., Kapila K. (2009). Comparison of sefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA. *Indian J Med Microbiol*, 27(1): 27-29.

Anonymous (2020). UK standarts for microbiology investigations. Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species. UK SMI ID: 7, Issue no: 4, Issue date: 26.05.20, England.

Argudín, M., Mendoza, M., González-Hevia, M., Bances, M., Guerra, B., Rodicio, M. (2012). Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. *Appl Environ Microbiol*, 78(8): 2930-2935.

Asfour, H.A.E., Darwish, S.F. (2011). Phenotypic and genotypic detection of both *mecA*- and *blaZ*-

genes mediated β -lactam resistance in *Staphylococcus* strains isolates from bovine mastitis. *Glob Vet*, 6(1): 39-50.

Bacigil, A.F., Taponen S., Koort, J., Bengtsson, B., Myllyniemi, A.L., Pyörälä, S. (2012). Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. *Acta Vet Scand*, 54(69): 1-7.

Bayston, R. (2006). Coagulase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, 62(1): 127.

Brakstad, O.G., Aasbakk, K., Maeland, J.A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J Clin Microbiol*, 30(7): 1654-1660.

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(5): 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(9): 886-892.

Clinical and Laboratory Standards Institute, (CLSI 2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement M100-S26 CLSI, Wayne, PA.

Depardieu, F., Perichon, B., Courvalin, P. (2004). Detection of van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 42(12): 5857-5860.

Donham, K.J. (2010). Community and occupational health concerns in pork production. *J Anim Sci*, 88: 102-111.

Dutka M.S., Evers, S., Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol*, 33(1): 24-27.

- Frey, Y., Rodriguez, J.P., Thomann, A., Schwendener, S., Perreten, V. (2013). Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis Milk. *J Dairy Sci*, 96: 2247-2257.
- Gandra, E., Fernandez, M.A., Silva, J.A., Silva, W.P. (2011). Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*. *Ciênc Tecnol Aliment*, 31(4): 946-949.
- Gencay, Y.E., Ayaz, N.D., Doğru, A.K. (2010). Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* and other staphylococcal isolates from various foods and food ingredients, *Erişyes Üniv Vet Fak*, 7(2): 75-80.
- Hanson, B.M., Dressler, A.E., Harper A.L., Scheibel R.P., Wardyn, S.E., Roberts, L.K., Kroeger J.S., Smith, T.C. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *J Infect Public Health*, 4: 169-174.
- Hauschild, T., Sacha, P., Wiczorek, P., Zalewska, M., Kaczyńska, K., Tryniszewska, E. (2008). Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a university hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochem Cytobiol*, 46(2): 225-228.
- John, J., George, S., Nori, S.R.C. Nelson-Sathi, S. (2019). Phylogenomic analysis reveals the evolutionary route of resistant genes in *Staphylococcus aureus*. *Genome Biol Evol*, 11(10): 2917-2926.
- Kaçmaz, B., Gül, S., Öztürk, D.B., Ecemiş, E. (2015). *Staphylococcus aureus* suşlarında koagülaz testi için uygun sıcaklığın araştırılması. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 75(2): 99-102.
- Kadariya, J., Smith, T., Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Res Int*, 2014: 827965.
- Kadiroğlu, P., Korel, F., Ceylan, Ç. (2019). Identification of *Staphylococcus aureus* cheese isolates with respect to virulence properties, genetic relatedness and antibiotic resistance profiles. *Food and Health*, 5(3): 149-159.
- Karmakar, A., Dua, P., Ghosh, C. (2016). Biochemical and molecular analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from hospitalized patients. *Can J Infect Dis Med*, 2016: 9041636.
- Kaya, H., Onmaz, N.E., Gönülalan, Z., Al, S. (2015). Kayseri ilinde tüketime sunulan tavuk etlerinde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması. *Erişyes Üniv Vet Fak*, 12(2): 93-98.
- Lee, J.H. (2003). Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol*, 69(11): 6489-6494.
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M.E., Leclercq, R., Vandenesch, F., Etienne, J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 1062-1066.
- Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. (2003). Staphylococcal food poisoning. *Genet Mol Res*, 2(1): 7-28.
- Martineau, F., Picard, F., Lansac, N., Menard, C., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G. (2000). Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(2): 231-238.
- 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.
- Olsen, J.E., Christensen, H., Aarestrup F.M. (2006). Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother*, 57: 450-460.
- Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K. (2005). Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin

- genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 246: 191-198.
- Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Shinagawa, K. (2002). Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol*, 40(3): 857-862.
- Ouoba, L.I.I., Lei, V., Jensen, L.B. (2008). Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int J Food Microbiol*, 121: 217-224.
- Özdemir, H., Keyvan, E. (2016). Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from beef, sheep and chicken meat. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 63: 333-338.
- Pal, M., Kerorsa, G.B., Marami, L.M., Kandi, V. (2020). Epidemiology, pathogenicity, animal infections, antibiotic resistance, public health significance, and economic impact of *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review. *Am J Public Health Res*, 8(1): 14-21.
- Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. (2009). Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from serious foods in Portugal. *Food Microbiol*, 26: 278-282.
- Pyzik, E., Marek, A., Pysniak, D.S., Chmiel, R.U., Jarosz, L.S., Podebska, I.J. (2019). Detection of antibiotic resistance and classical enterotoxin genes in coagulase negative staphylococci isolated from poultry in Poland. *J Vet Res*, 63: 183-190.
- Reyes, J., Hidalgo, M., Diaz, L., Rincon, S., Moreno, J., Vanegas, N., Castaneda, E., Arias, C.A. (2007). Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrwide surveillance. *Int J Infect Dis*, 11: 329-336.
- Saad, M.S., A, N., Elroos, A., Abdel-Fadeel, S.R. (2018). Incidence and characterization of *S. aureus* in broiler carcasses. *Benha Veterinary Medical Journal*, 34(2): 191-200.
- Sadiq, A., Samad, M., Saddam, Basharat, N., Ali, S., Roohullah, Saad, Z., Khan, A.N., Ahmad, Y., Khan, A., Khan, J. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in slaughter houses and meat shops in capital territory of Pakistan during 2018-2019. *Front Microbiol*, 11: 1-12.
- Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Cohn, M., Lindqvist, R., Barker, G. (2011). The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, 2(6): 580-592.
- Sırıken, B., İnat, G., Yıldırım, T., Yavuz, C., Çiftci, A. (2018). Methicillin resistance coagulase positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and cheese, Samsun province-Turkey. *Gıda Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi*, 20: 55-63.
- Swenson, J.M. (2002). News tests for the detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Newslett*, 24(21): 159-163.
- Takayama, Y., Tanaka, T., Oikawa, K., Fukano, N., Goto, M., Takahashi, T. (2015). Prevalence of *blaZ* gene and performance of phenotypic tests to detect penicillinase in *Staphylococcus aureus* isolates from Japan. *Ann Lab Med*, 38: 155-159.
- Temiz, A. (1994). *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*. Şafak Matbaacılık Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, 266 s. ISBN:975-95834-0-2
- Tomasz, A., Drugeon H.B., Lencastre, H.M., Jabes, D., McDougal, L., Bille, J. (1989). New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain modified penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother*, 33: 1869-1874.
- Ullah, F., Malik, S.A., Ahmed, J., Ullah, F., Shah, S.M., Ayaz, M., Hussain, S., Khatoon, L. (2012). Investigation of the genetic basis of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* from Pakistan. *Trop J Pharm Res*, 11(6): 925-931.
- Vandenesch, F., Lebeau, C., Bes, M., Mcdevitt, D., Greenland, T., Novickj, R.P., Etienne, J. (1994). Coagulase deficiency in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* involves both transcriptional

- and post-transcriptional defects. *J Med Microbiol*, 40: 344-349.
- Vakulenko, S.B., Donabedian, S.M., Voskresenskiy, A.M., Zervos, M.J., Lerner, A., Chow, J.W. (2003). Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(4): 1423-1426.
- Wang, W., Baloch, Z., Jiang, T., Zhang, C., Peng, Z., Li, F., Fanning, S., Ma, A., Xu J. (2017). Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China. *Front Microbiol*, 8: 1-11.
- Woegerbauer, M., Zeinzinger, J., Springer, B., Hufnagl, P., Indra, A., Korschineck, I., Hofrichter, J., Kopacka, I., Fuchs, R., Steinwider, J., Fuchs, K., Nielsen, K.M., Allerberg, F. (2014). Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(3')-IIIa* and *aph(3')-IIa* in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Austria. *J Med Microbiol*, 63: 210-217.
- Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Zhang, F., Yang, X., Wu, H., Zeng, H., Chen, M., Ding, Y., Wang, J., Lei, T., Zhang, S., Xue L. (2018). *Staphylococcus aureus* isolated from retail meat and meat products in China: incidence, antibiotic resistance and genetic diversity. *Front Microbiol*, 9: 1-14.
- Wu, S., Zhang, F., Huang, J., Wu, Q., Zhang, Y., Xue, L., Wang, J., Ding, Y. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of PVL-positive *Staphylococcus aureus* isolated from retail foods in China. *Int J Food Microbiol*, 304: 119-126.
- Yang, F., Wang, O., Wang, X., Wang, L., Xiao, M., Li, X., Luo, J., Zhang, S., Li, H. (2015). Prevalence of *blaZ* gene and other virulence genes in penicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis cases in Gansu, China. *Turk J Vet Anim Sci*, 39: 634-636.
- Yogurtcu, N.N., Tuncer, Y. (2013). Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish tulum cheese. *Int J Dairy Technol*, 66: 236-242.
- Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., Gregson, D.B., Louie, T., Conly, J.M. (2004). New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance, and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, 42: 4947-4955.

KANTİTATİF MİKROBİYOLOJİK ANALİZLERDE ÖLÇÜM BELİRSİZLİĞİ HESAPLANMASINDA FARKLI YAKLAŞIMLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Nuray Gamze Yörük*

Kocaeli Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Birimi, Kocaeli, Türkiye

Geliş / Received: 06.02.2021; Kabul / Accepted: 24.04.2021; Online baskı / Published online: 05.05.2021

Yörük, N. G. (2021). Kantitatif mikrobiyolojik analizlerde ölçüm belirsizliği hesaplanmasında farklı yaklaşımların karşılaştırılması. *GIDA* (2021) 46 (3) 707-725 doi: 10.15237/gida. GD21033.

Yörük, N. G. (2021). Comparison of various approaches in calculation of measurement uncertainty in quantitative microbiological analysis. *GIDA* (2021) 46 (3) 707-725 doi: 10.15237/gida. GD21033.

ÖZ

TS EN ISO/IEC 17025:2017 standardı ile akreditasyon kapsamındaki laboratuvarlar, sonuçlarının güvenilirliğini ortaya koyabilmek için analiz süresince ölçüm sonucuna yansıma etkisi bulunan tüm değişkenlerin (matris, donanım, vb) dağılımlarını karakterize ederek, ölçümün sonucuyla bağlantılı olan parametreler olarak tanımlanan kantitatif analizlerinde akreditasyonun bir parçası olan ölçüm belirsizliği hesaplamalarını değişik metotlarla gerçekleştirmektedirler. Araştırma, ölçüm sonuçlarına etki ederek değişikliklere neden olan tüm değişkenlerin kullanılmasıyla ortaya çıkan ölçüm belirsizliklerinin farklı yöntemlerle hesaplanmasını içermektedir. Bu çalışmada, sütlerde ISO 4833-1 standardına göre toplam mezofilik aerobik mikroorganizma, yemeklerde ISO 7932 metodu ile *Bacillus cereus*, peynirlerde ise ISO 16649-2 standardı ile *Escherichia coli* analizleri çalışılmıştır. Tüm veriler, International Organization of Standardization (ISO) standardı, NordVal International (NMKL) No.8 yöntemi ve EuroLab Teknik Prosedürüne (EuroLab) göre log₁₀ tabanına çevrilerek istatistiki olarak değerlendirilmiştir. ISO/TS 19036 metoduna ait belirsizliklerin EuroLab Teknik Prosedürüne göre anlamlı ($P < 0.05$) ISO/TS 19036 standardı ve EuroLab Teknik Prosedürünün ise NMKL No.8 yöntemine göre daha hassas belirsizlik verdikleri ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Mikrobiyolojik analiz, ölçüm belirsizliği, ISO 19036, EuroLab teknik prosedürü, NMKL No. 8

COMPARISON OF VARIOUS APPROACHES IN CALCULATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY IN QUANTITATIVE MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

ABSTRACT

Laboratories accredited with TS EN ISO/IEC 17025:2017 standard characterize distribution of all variables (matrix, hardware, etc.) that have reflection effects on measurement results throughout analysis and use different methods to conduct measurement uncertainty calculations as a part of accreditation in quantitative analysis defined as parameters linked to measurement result. The study involves calculation using various methods of measurement uncertainties that emerge from using all variables that cause changes by effecting measurement results. In this study, total mesophilic aerobic microorganisms were studied in milk according to ISO 4833-1 standards, ISO 7932 method was used

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: nuraygamzeyoruk@gmail.com

☎: (+90) 505 350 5425

☎: (+90) 262 312 1065

Nuray Gamze Yörük; ORCID no; 0000-0003-0867-4141

in food to study *Bacillus cereus*, while in cheese ISO 16649-2 standard was used to study *Escherichia coli* analysis. All data were converted to base log₁₀ and statistically assessed using International Organization of Standardization (ISO) standard, NordVal International (NMKL) No.8 method and EuroLab Technical Procedure. It was established that uncertainties under ISO/TS 19036 method were creating more significant uncertainties ($P < 0.05$) while ISO/TS 19036 standard and EuroLab Technical Procedure were resulting in more sensitive uncertainties compared to NMKL No.8 method.

Keywords: Microbiological analysis, measurement uncertainty, ISO 19036, EuroLab Technical Procedure, NMKL No. 8

GİRİŞ

Evrensel düzende gıda canlılar için temel bir ihtiyaç olmakla beraber zamanla sağlık açısından bir tehdit unsuru da olmaya başlamıştır. Bu durum ne yazık ki günümüze kadar artan düzeylerde çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik etmenler nedeni ile meydana gelmiş, artan popülasyonla beraber teknoloji çağının getirdiği yeniliklerin olumlu yönde kullanılmaması bu tür risk unsurlarının artışına kimi zaman olumsuz yönde katkıda bulunmuştur. Gıda güvenliği ve halk sağlığı bir bütün olarak ele alındığında, canlıların vazgeçilemez temel yaşam kaynağı olan gıdalarda denetim ve analiz ilişkisine dayalı kontrol mekanizmalarının daha sağlam, güvenilir ve doğru işletilmesinin gerekliliğinin önemi ortaya çıkmaktadır. Özellikle gıdalarda mikrobiyolojik analizleri gerçekleştiren laboratuvarların ise tüm analizlerinde akreditasyon kriterleri doğrultusunda yöntemlerini belirleyerek ulusal ve uluslararası platformlarda analiz sonuçlarını geçerli kıldıklarını göstermelerinin gerekliliği her geçen gün daha da artmaktadır. Çünkü, gıda kaynaklı enfeksiyon ve/veya intoksikasyonların temelinde mikrobiyel etkenler rol oynamaktadır. Bu sebeple gıda analizlerinin ulusal ve/veya uluslararası standartları esas alınarak gerçekleştirilmesi gerek halk sağlığı gerek ürün güvenliği noktalarında fayda sağlayacak, uluslararası boyutta gerçekleştirilmesi planlanan ticari anlaşmalara bile olumlu etkileri zamanla daha fazla yansıyacaktır. Gıda analizlerini TS EN ISO/IEC 17025: 2017 “Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yetkinliği için Genel Gereklilikler” standardı ile gerçekleştiren akredite laboratuvarlar standardın tüm gerekliliklerini yerine getirmek durumundadırlar. Diğer bir deyişle, bu standardın 7.2 Metotların Seçilmesi, Doğrulanması ve Geçerli Kılınması maddesinde, laboratuvarın analizleri için kullandığı metotlarını

uygun bir şekilde geçerli kıldığını veya doğruladığını göstermesinin laboratuvarlar tarafından sağlanması gereken bir akreditasyon şartı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, bir ölçümün kalitesinin, laboratuvar tarafından analize ilişkin metodun geçerli kılınması/doğrulanması, ölçüm belirsizliğinin tahmini, izlenebilirliğin sağlanması ile ortaya konulmasının gerekliliği ve kalite kontrol çalışmaları ile devamlılığının sağlanması gerektiği de belirtilmiştir (TÜRKAK, 2019). ISO 17025 standardına göre bir metodun geçerli kılınması, belirlenen gerekliliklerin amaçlanan kullanım için yeterli olduğu durumlarda yapılan doğrulama olarak tanımlanırken; doğrulamanın ise belirli bir ögenin belirlenmiş gereklilikleri karşıladığına dair nesnel kanıt sağlaması şeklinde ifade edilmektedir (ISO, 2017; TÜRKAK, 2019). Laboratuvar analiz sonuçlarının geçerli kılınması için öncelikle ölçüm doğruluğunu yani elde ettiği sonuç ile gerçek değer arasındaki ilişkiyi ortaya koymalıdır (Forster, 2003; ISO, 2017a, TÜRKAK, 2019). Bu şekilde ölçümlerin doğruluğu hesaplanırken, doğruluğun 2 unsuru olan gerçeklik ve kesinlik göz önünde bulundurulurken; kesinlikte ise tekrarlanabilirlik (s_r), ara kesinlik ve tekrarüretilebilirlik (S_R) sonuçları hesaba katılmaktadır (ISO, 2017b; TÜRKAK, 2019; Yılmaz vd., 2019; ISO, 2021). Bunun bir faydası ölçüm belirsizliğine etki eden tüm risklerin ortaya konulmasıdır (Dereani ve Sarić, 2010).

Gıda analizlerini TS EN ISO/IEC 17025: 2017 “Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yetkinliği için Genel Gereklilikler” standardı ile gerçekleştiren akredite laboratuvarlar standardın tüm gerekliliklerini yerine getirmek durumundadırlar. Diğer bir deyişle, bu standardın 7.2 Metotların Seçilmesi, Doğrulanması ve Geçerli Kılınması maddesinde, laboratuvarın analizleri için kullandığı metotlarını uygun bir

şekilde geçerli kıldığını veya doğruladığını göstermesinin laboratuvarlar tarafından sağlanması gereken bir akreditasyon şartı olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, bir ölçümün kalitesinin, laboratuvar tarafından analize ilişkin metodun geçerli kılınması/doğrulanması, ölçüm belirsizliğinin tahmini, izlenebilirliğin sağlanması ile ortaya konulmasının gerekliliği ve kalite kontrol çalışmaları ile devamlılığının sağlanması gerektiği de belirtilmiştir (TÜRKAK, 2019).

ISO 17025 standardına göre bir metodun geçerli kılınması, belirlenen gerekliliklerin amaçlanan kullanım için yeterli olduğu durumlarda yapılan doğrulama olarak tanımlanırken; doğrulamanın ise belirli bir ögenin belirlenmiş gereklilikleri karşıladığına dair nesnel kanıt sağlaması şeklinde ifade edilmektedir (ISO, 2017; TÜRKAK, 2019). Laboratuvar analiz sonuçlarının geçerli kılınması için öncelikle ölçüm doğruluğunu yani elde ettiği sonuç ile gerçek değer arasındaki ilişkiyi ortaya koymalıdır (Forster, 2003; ISO, 2017a, TÜRKAK, 2019). Bu şekilde ölçümlerin doğruluğu hesaplanırken, doğruluğun 2 unsuru olan gerçeklik ve kesinlik göz önünde bulundurulurken; kesinlikte ise tekrarlanabilirlik (s_r), ara kesinlik ve tekrarüretilebilirlik (S_R) sonuçları hesaba katılmaktadır (ISO, 2017b; TÜRKAK, 2019; Yılmaz vd., 2019; ISO, 2021). Bunun bir faydası ölçüm belirsizliğine etki eden tüm risklerin ortaya konulmasıdır (Dereani ve Sarić, 2010).

Metot geçerli kılma çalışmalarında uygulanan ölçüm belirsizliği hesaplamalarında ideal olarak aynı laboratuvarda, aynı numune ve metot ile farklı zamanlarda farklı analistler, farklı donanım vb. kullanılarak elde edilen orta/ara kesinlik veya laboratuvar içi uyarlık olarak tanımlanan standart sapma değeri kesinlik verisi olarak kullanılmaktadır (TÜRKAK, 2015). Kantitatif mikrobiyolojik analizlerde kesinliğin ve gerçekliğin doğrulanması gerekmektedir. Kesinliğin doğrulanması sırasında Ölçüm Belirsizliği de hesaplanmaktadır. Bu sırada ölçümün belirsizliğine katkı sağlayan çeşitli kaynaklarda bulunmaktadır (Forster, 2003; ISO, 2019; Yılmaz vd., 2019; ISO, 2021). Bu kaynaklar;

Teknik belirsizlik; operasyonel değişiklikler, dilüsyon, tekrarüretilebilirlik kaynaklı sapmalar,

-Matriks belirsizliği; matriks çeşidi ve içinde homojen karışımı sağlanamamış mikroorganizma çalışmalarından düşük seviyeli tekrarüretilebilirlik verilerinin elde edilmesi, vb.

-İstatistiksel dağılım belirsizliği; test organizmasının sayımı ve doğrulanmasında koloni sayımı için poisson dağılımı ya da doğrulama belirsizliğinin kullanımı; en muhtemel sayım yöntemi için en muhtemel sayım yöntemi belirsizliğidir (EuroLab, 2007; ISO, 2019).

Belirsizlik hesabı ile ilgili iki ayrı yaklaşım bulunmaktadır;

-Global Yaklaşım = Top down = Kara kutu = Yukarıdan aşağıya ilerleme = Tüme varım

-Bileşen Yaklaşımı = Bottom up = Adım adım = Aşağıdan yukarı ilerleme = Tümden gelim

Çizelge 1. Global yaklaşım ile bileşen yaklaşımının optimum kullanım alanları (NMKL, 2017; ISO, 2019)

Table 1. Optimum Uses Area of Component Approach with Global Approach (NMKL, 2017; ISO, 2019)

Global Yaklaşım (Global Approach)	Bileşen Yaklaşımı (Component Approach)
Operasyonel varyansın dağılım varyansından büyük olması beklenen katı örneklerde	Düşük mikroorganizma yükü var ise
Çalışılan örneklerde heterojenlik fazla ise	
Laboratuvarlar arası karşılaştırma yapılacak ise	

Ölçüm belirsizliği, yapılan ölçümün hangi değerler arasında yer alacağını, güven aralığını anlatmaktadır. Belirsizlik ölçüm sonuçlarının dağılımını göstermekle beraber tam olarak ortadan kaldırılamaz. Ancak, hiçbir zamanda tam olarak hesaplanamaz. Tek başına bir analiz değildir (Corry, 2007). %95 güven aralığında tahminidir ve ancak belirsizliğe etki eden faktörlerin iyileştirilmesi ile küçültülebilir ve %99 olarak bile güven aralığı sağlanabilir. Belirsizliğin hesaplanmasında tekrarüretilebilirlik verilerinin kullanılması dolayısı ile tekrarüretilebilirliği etkileyen faktörler olan;

-Zaman (Z): Birbirini izleyen ölçmeler arasındaki zaman aralığı kısa veya uzun olmalıdır.

-Kalibrasyon (K): Birbirini izleyen ölçmelerin gruplar arasında farklı donanım ile kalibre edilmeden önce ve sonraki şekilde kullanımudur.

-Deneyi yapan kişi (O): Birbirini izleyen ölçmelerin farkı deneyi yapan kişiler tarafından gerçekleştirilmesidir.

-Donanım (D): Ölçmelerde farklı donanımın kullanılmasıdır (TS, 2000; Lombard, 2006; ISO, 2021).

Ölçüm sonuçları referans materyal, yeterlilik testleri, ilgili analize ilişkin standart, numunenin homojen dağılımı, referans kültürün homojen dağılımı, tek suş ya da çokça mikroorganizma bulunan ortamlarda hedef mikroorganizmanın baskılanması, mikrobiyel gelişim ya da ölme, analist etkisi, gerçek koloni sayımı, donanımın kalibrasyon durumu, istatistiksel dağılım gibi tüm bu faktörlerle etkilenir (NMKL, 2004; Gašljević, 2004).

ISO 17025 standardına göre bazı durumlarda deney metodunun kendisinden kaynaklı ölçüm belirsizliği dikkatli, metrolojik ve istatistiksel olarak hesaplanamamakta işte bu şekilde deney yönteminin ölçüm belirsizliğinin kesin olarak değerlendirmesinin mümkün olmadığı durumlar içinse ya analizle ilgili tüm belirsizlik bileşenleri ayrı ayrı ortaya konulmalı ya da yöntemin uygulanmasına yönelik uygun bir tahminde bulunulması önerilmektedir (TÜRKAK, 2015; ISO, 2017a; VIM, 2008). Bu anlamda akreditasyonun İyi Laboratuvar Uygulamalarına yardımcı olarak çeşitli belirsizlik kaynaklarını

minimize etmeye yarayan bir sistem olduğu ortaya çıkmaktadır (Jarvis vd., 2007).

Bu çalışmanın amacı, gıda zehirlenmelerinin temelinde çoğunlukla risk teşkil eden mikrobiyel kaynaklı etmenlere yönelik gerçekleştirilen ISO 7932 metodu ile yemeklerde *B. cereus*, ISO 16649-2 metodu ile peynirlerde *E. coli* ve ISO 4833-1 metodu ile sütlerde toplam mezofilik aerobik mikroorganizmaların mikrobiyolojik analizlerde kesinliği sağlamak üzere yapılan çalışmalardan biri olan tekrarüretilebilirlik çalışmalarının doğruluğu kabul edilmiş çeşitli uluslararası metot ve yaklaşımlarla ölçüm belirsizliği sonuçlarının karşılaştırmalı olarak ortaya konulmasıdır. Elde edilen ölçüm belirsizliği verileri ile bu tarz çalışmalarda hangi metotla hangi aralıkta çalışılabileceği ve ilgili metodun ne kadar hassasiyetle istatistiksel sonuçlar verdiği irdelenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmada, tekrarlanabilirlik çalışmaları ardından her analize ait ölçüm belirsizliklerinin ortaya konulabilmesi için yapılan tekrarüretilebilirlik çalışmalarında sahada sıklıkla ilgili numunelerde herhangi bir kontamine durum söz konusu olduğunda ya da yeterli ısı işlem uygulamaları ve hijyen kriterlerine dikkat edilmediğinde enfeksiyon ya da intoksikasyona neden olan ayrıca heterojenlikleri ile elde edilebilecek en büyük ölçüm belirsizlikleri ile karşılaştırma yapılması bakımından 3 ayrı gıda matriksi ile (yemek, peynir ve süt) 3 farklı analiz metodu kullanılarak (ISO 7932 metodu ile *B. cereus*, ISO 16649-2 metodu ile *E. coli* ve ISO 4833-1 metodu ile toplam mezofilik aerobik mikroorganizma) paralel olarak, 4 farklı analist tarafından 10 ayrı günde ve tüm şartlar değiştirilerek (matriks, etüv, pipet, terazi, besiyeri, dilüsyon, hacim, vb donanımlar) çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada, *B. cereus* ile çalışma yapılabilmesi için yemek numuneleri NCTC 7464, *B. cereus* suşu ile toplam mezofilik aerobik mikroorganizma çalışmalarında sütler NCTC 10400 *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* suşu ile, *E. coli* çalışmalarında peynir numuneleri NCTC 10788 *E. coli* suşu ile

kirletme yapılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizlerin gerçekleştirilmesi için aseptik ortam koşullarında ve otoklavlanarak steril hale getirilmiş 10 g/mL olarak tartımı yapılan tüm numunelere 90mL tamponlanmış peptonlu su (Liofilchem® REF 499030, ITALY) ilave edilerek, değişen dilüsyonlarda spike işlemi gerçekleştirilmiş (mikroorganizma yükleri önceden belirlenmiş) ve toplam mezofilik aerobik mikroorganizması ile kontamine süt numuneleri ile *B. cereus* ile kontamine yemek numuneleri 30°C'de 24 saat, *E. coli* ile kontamine peynir numuneleri ise 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, *E. coli* sayım analizleri için TBX agara (LAB M- Neogen Culture Media NCM1001A Harlequin TBGA, UK) dökme metoduna göre, *B. cereus* sayımı için *Bacillus cereus* mediuma (LAB M Neogen Culture Media LAB073, UK) yayma metoduna göre, toplam mezofilik aerobik mikroorganizma sayımı için Plate Count agara (LAB M- Neogen Culture Media NCM0010A, UK) dökme metoduna göre ekimler yapılarak sırayla, 41,5°C'de 24 saat, 30°C'de 48 saat, 30°C'de 72 saat inkübe edilerek, sayımlar yapılmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar log₁₀ tabanına çevrilerek ve 1. analist 2. analistle, 1. analist 3. analistle, 1. analist 4. analistle, 2. analist 3. analistle, 2. analist 4. analistle ve 3. analist 4. analistle karşılaştırılarak ISO/TS 19036, NMKL No.8 standartları ve EuroLab teknik prosedürü (EuroLab, 2007; Torlak, 2012) ile değerlendirilerek, 3 ölçüm belirsizliği yaklaşımı arasındaki hassasiyet farkı istatistiksel olarak ortaya konulmuştur.

ISO 19036 Metodu ile Ölçüm Belirsizliği Analizi

Analistler için değişken olarak oluşturulan A ve B koşulları bulunur. A koşulunda kullanılan tüm faktörlerin B koşulunda kullanılmadığı yine B koşulundaki tüm faktörlerin ise A koşulunda kullanılmadığı ortamlarda gerçekleştirilen analizler, (örn; farklı parti besiyerinin kullanımı, test porsiyonlarına farklı suşların inokülasyonu, farklı inkübatörlerde inkübasyonun yapılması, farklı otomatik pipet kullanımı ve farklı hacim ölçerler gibi analizin her basamağında olası muhtemel değişkenliklerin sağlanması, vb).ile

analistlerin sonuçları a_i ve b_i olarak ele alınmıştır (ISO, 2019; Yılmaz vd., 2019; ISO, 2021).

a_i: Farklı koşullarda ortaya çıkan analist sonucu
b_i: Farklı koşullarda ortaya çıkan diğer analistin sonucu
n: çalışmadaki tekrar sayısı
S_R: tekrarüretilebilirlik standart sapması
S_{IR}: laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapması

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (a_i - b_i)^2}{2n}} \quad (1)$$

Tekrarüretilebilirlik çalışmalarından elde edilen standart sapmanın (s), tüm ölçümlerin ortalamasına (\bar{x}) oranı bağıl standart sapmayı verir (RSD- RSD_R). RSD formülizasyonu (2) ile gösterilmiştir.

$$RSD = \frac{s \text{ standart Sapma}(s)}{\text{Ortalama}(x)} RSD_R = \frac{s}{\bar{x}} \quad (2)$$

Birleştirilmiş tekrarüretilebilirlik relatif standart sapması (RSD_{RC}) ise toplam bağıl standart sapmanın n çalışma tekrar sayısına bölümünün karekökünü ifade etmektedir.

$$RSD_{RC} = \sqrt{\frac{\sum RSD_R^2}{n}} \quad (3)$$

RSD_{RC}: birleştirilmiş tekrarüretilebilirlik relatif standart sapması
ΣRSD: toplam bağıl standart sapma

NMKL No.8 Standardı ile Ölçüm Belirsizliği Analizi

NMKL No.32'nin atıfta bulunarak temel aldığı NMKL No.8 standardı tekrarüretilebilirlik ve ölçüm belirsizliği hesaplamalarını içerir. Değişkenler aynı ISO 19036 standardında belirtildiği gibidir. NMKL No. 8 standardına göre tekrarüretilebilirlik verileri tekrarlanabilirlik verilerinden de elde edilebilir (NMKL, 2004; Yılmaz vd., 2019).

İlk olarak Toplam Standart sapma hesaplanır:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (4)$$

S_r : Standart Sapma

\bar{x} : Sonuçların ortalaması

n : Çalışılmış olan tekrar sayısı

x_i : Her bir analistin sonucu

Verilerin ortalamaları alınır,

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (5)$$

Standart sapmaların ortalaması alınır,

$$S_r = \sqrt{\frac{S_{r_1}^2 + S_{r_2}^2 + S_{r_3}^2 + S_{r_4}^2}{4}} \quad (6)$$

Ortalamaların standart sapması hesaplanır,

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - y)^2}{n-1}} \quad (7)$$

x_i : Her bir analistin sonucu

y : 2 analistin tüm sonuçlarının (log10) ortalaması

Gruplar arası varyans S_{L^2} hesaplanır;

$$S_L^2 = S_x^2 - \frac{S_r^2}{n} \quad (8)$$

Standart belirsizlik hesaplanır;

$$u = S_R = \sqrt{S_r^2 + S_L^2} \quad (9)$$

S_R : Standart belirsizlik

$$U = 2 S_R \quad (10)$$

U : Genişletilmiş ölçüm belirsizliği

EuroLab Teknik Prosedürü ile Ölçüm Belirsizliği Analizi

Çalışmalarda ISO 19036 ve NMKL No. 8 standartları ile beraber Eurolab Teknik Prosedürü No.1 (2007) bölüm 3.1. Verifikasyonlarda Ölçüm Belirsizliği ile hesaplamalar dahilinde de çalışmalar paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Koloni sayımı tekniğinde, petrideki koloni sayısı azaldıkça ve

genel tasarım düşük sayımlar için uygun olmadığından, öngörülemeyen varyasyon hızla artmaktadır. Bu teknik prosedüre göre petride koloni sayısı 10'dan az olan sayım sonuçlarının hesaplamalardan çıkarılması gerekmektedir (EuroLab, 2007; Torlak, 2012). Gerek çalışmada 10'dan küçük koloni elde edilememesi (yükleri belli dilüsyondaki numuneler) gerekse istatistiksel metot hesaplamalarında standart ya da metotlara eşit koşullarda davranılması gerektiğinden araştırmada elde edilen sonuçların tümü \log_{10} 'a çevrilmiştir. Laboratuvar içi tekrarüretilebilirlik standart sapma hesabı ve tanımlamalar formüllerle beraber verilmiştir.

$$RSDR_{W} = \frac{\bar{R}}{d_2} \quad (11)$$

RSD: bağıl standart sapma

\bar{R} : ortalama bağıl değer aralığını verir.

d_2 : dönüşüm faktörünü verir. Paralel sayımlar için

d_2 faktörü kullanılır. $d_2 = 1.128$ olarak alınır.

$$R = \frac{\sum R_i}{n} \quad (12)$$

n kadar sayıda paralel sayım için.

R_i : Gerçek bağıl değeri verir.

$$R_i = \frac{A_i - B_i}{m_i} \quad (13)$$

A_i, B_i : 2 analistin verileri

m_i : 2 analistin sonuçlarının aritmetik ortalaması

$$U = k * u \quad (14)$$

k : % 95 güven aralığı kapsama faktörü 2

u : $RSDR_W$ hesabından gelen belirsizlik

İstatistiksel Analizler

Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi amacıyla ilk olarak tüm sonuçlar 3 farklı metoda ait formüllerle Excel üzerinde hesaplanmıştır. Elde edilen verilerin analizi SPSS 24.0 ile yapılmıştır. Çalışmada 4 farklı değerlendiricinin önce 2 farklı formül ile S_r ve U değerleri hesaplanmış ve aralarındaki uyum gösterme durumunun incelenmesi için Kendall's tau b Katsayısı ve Spearman's rho Katsayısı hesaplanmıştır. Bununla

birlikte 3 değişik metot birbirleri ile karşılaştırılmış olup Çizelge 2 ve Çizelge 3' de gösterilmiştir. ISO 19036 standardı ile EuroLab Teknik Prosedürü ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının karşılaştırılması amacıyla bağımlı gruplar *T testi* yapılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışma sonuçlarımız ISO 19036, NMKL No.8 ve EuroLab Teknik Prosedürüne göre istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. ISO 19036 metodu ile EuroLab Teknik Prosedürü ölçümlerinin karşılaştırılması amacıyla yapılan bağımlı gruplar *t testi* sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. ISO 19036, NMKL No.8 ve EuroLab Teknik Prosedürüne ait S_R ve U değerlerinin karşılaştırılması ise Çizelge 3' de gösterilmiştir. ISO 19036 ve EuroLab Teknik Prosedürü değerleri arasındaki yakınlık

karşılaştırması ise Şekil 1, Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6 ve Şekil 7' deki Regresyon grafikleri ile ortaya konulmuştur. ISO 19036, EuroLab Teknik Prosedürü ve NMKL No.8'e ait Ölçüm Belirsizliği Karşılaştırmalarına ait farklılıklar ise Çizelge 4, Çizelge 5, Çizelge 6, Çizelge 7, Çizelge 8 ve Çizelge 9'da ifade edilmiştir.

ISO 19036 metodu ile EuroLab Teknik Prosedürü değerleri karşılaştırıldığında analiz sonuçlarına göre 1.analist ile 2. analist, 1. analist ile 3. analist, 1. analist ile 4. analist, 2. analist ile 3. analist, 2. analist ile 4. analist ve 3. analist ile 4. analist arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($P < 0.01$) ve EuroLab Teknik Prosedürü değerleri daha yüksek çıkmıştır ($P < 0.05$) (Çizelge 2).

Çizelge 2. ISO 19036 metodu ile EuroLab teknik prosedür ölçümlerinin karşılaştırılması

Table 2. Comparison of EuroLab technical procedure and ISO 19036 method

	U değerleri Ortalaması	U değerleri ss	t	P
ISO 19036 Standardı (1-2)	0.102645	0.0421861	-8.119	0.000*
EuroLab Teknik Prosedürü (1-2)	0.246673	0.1347559		
ISO 19036 Standardı (1-3)	0.160073	0.0782535	-8.453	0.000*
EuroLab Teknik Prosedürü (1-3)	0.325024	0.1421011		
ISO 19036 Standardı (1-4)	0.136485	0.0919991	-7.083	0.000*
EuroLab Teknik Prosedürü (1-4)	0.305074	0.1635145		
ISO 19036 Standardı (2-3)	0.124502	0.0836366	-6.942	0.000*
EuroLab Teknik Prosedürü (2-3)	0.265663	0.1404392		
ISO 19036 Standardı (2-4)	0.137362	0.0807755	-8.220	0.000*
EuroLab Teknik Prosedürü (2-4)	0.302410	0.1496958		
ISO 19036 Standardı (3-4)	0.093406	0.0229582	-9.631	0.000*
EuroLab Teknik Prosedürü (3-4)	0.234399	0.0989758		

* $P < 0.05$ (Global Yaklaşım değerleri ile ISO 19036 değerleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu ortaya çıkmıştır)

ss: Kendall's tau_b Katsayısı ve Spearman's rho katsayısı ile hesaplama

t: T testini tanımlamaktadır.

P: P değeri istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

U değeri: Ölçüm belirsizliğini tanımlamaktadır.

Çizelge 3. NMKL No.8 – ISO 19036 – EuroLab teknik prosedürü karşılaştırması
 Table 3. Comparison of NMKL No.8 – ISO 19036 – EuroLab technical procedure

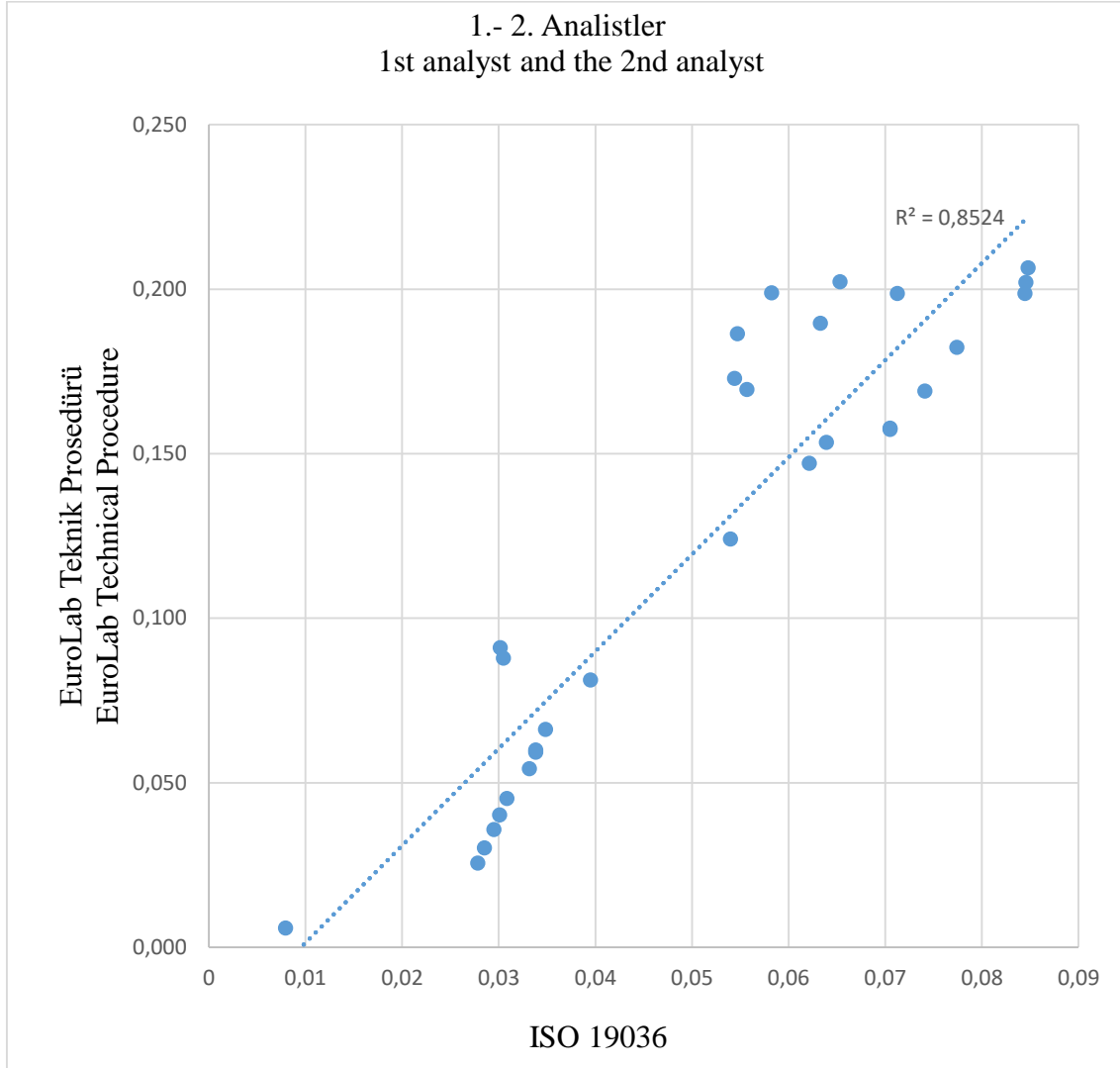
		Yemek (<i>B. cereus</i>)	Peynir (<i>E. coli</i>)	Süt (<i>Toplam Mezofilik Aerobik Koloni.</i>)
NMKL (1-2)	U	2.9831	2.8559	2.8594
	SR	1.4915	1.4279	1.4297
NMKL (1-3)	U	3.0099	2.8613	2.8398
	SR	1.5050	1.4306	1.4199
NMKL (1-4)	U	2.9876	2.9012	2.7865
	SR	1.4938	1.4506	1.3933
NMKL (2-3)	U	3.0000	2.7815	2.8616
	SR	1.5000	1.3908	1.4308
NMKL (2-4)	U	2.9776	2.8226	2.8087
	SR	1.4888	1.4113	1.4043
NMKL (3-4)	U	3.0045	2.8280	2.7914
	SR	1.5022	1.4140	1.3957
ISO 19036 (1-2)	U	0.1353	0.1145	0.0581
	SR	0.0677	0.0573	0.0290
ISO 19036 (1-3)	U	0.1232	0.2100	0.1471
	SR	0.0616	0.1050	0.0735
ISO 19036 (1-4)	U	0.0819	0.2046	0.1229
	SR	0.0410	0.1023	0.0614
ISO 19036 (2-3)	U	0.0768	0.1867	0.1100
	SR	0.0384	0.0934	0.0550
ISO 19036 (2-4)	U	0.0893	0.1936	0.1292
	SR	0.0446	0.0968	0.0646
ISO 19036 (3-4)	U	0.0998	0.1067	0.0737
	SR	0.0499	0.0534	0.0368
EuroLab Teknik Prosedürü (1-2)	U	0.3852	0.2703	0.0846
	SR	0.1926	0.1351	0.0423
EuroLab Teknik Prosedürü (1-3)	U	0.3267	0.4559	0.1926
	SR	0.1633	0.2279	0.0963
EuroLab Teknik Prosedürü (1-4)	U	0.2990	0.4671	0.1491
	SR	0.1495	0.2336	0.0745
EuroLab Teknik Prosedürü (2-3)	U	0.2627	0.4041	0.1302
	SR	0.1313	0.2021	0.0651
EuroLab Teknik Prosedürü (2-4)	U	0.2679	0.4543	0.1850
	SR	0.1339	0.2272	0.0925
EuroLab Teknik Prosedürü (3-4)	U	0.2822	0.3064	0.1146
	SR	0.1411	0.1532	0.0573

SR: Tekrarüretilebilirlik Standart Sapması

U: Ölçüm Belirsizliği

SR değeri 0'a yaklaştıkça değişim daha az olduğu için tutarlılık daha yüksektir. Buna göre

U değeri 0'a yakın olan sonuçlarda daha az sapma vardır.

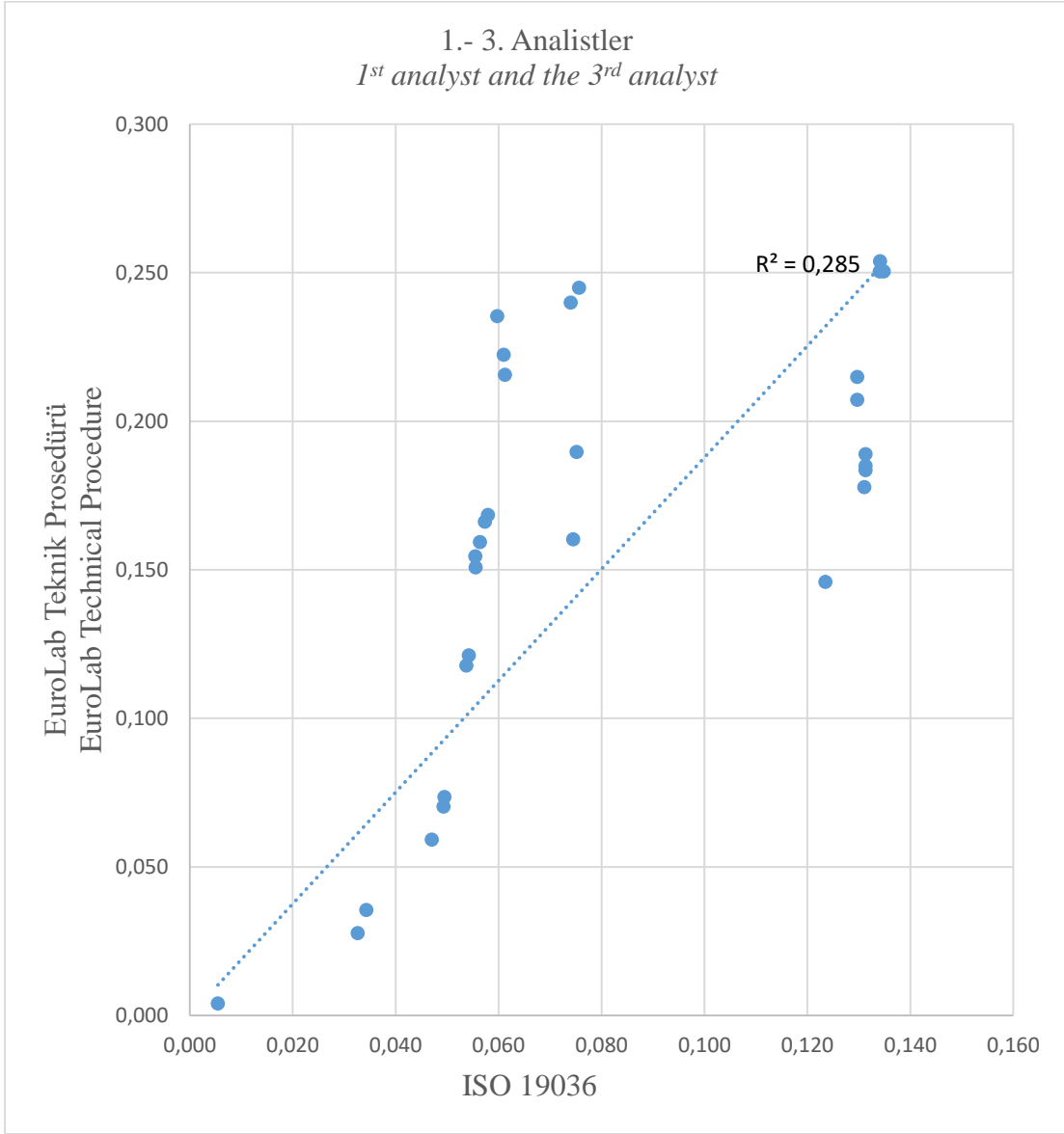


*R: Regresyon katsayısı

Şekil 1. 1. analist ile 2. analistin ISO 19036 ile hesaplanan S_R değerleri ile EuroLab teknik prosedürü formülü kullanılarak hesaplanan S_R değerleri arasındaki ilişki grafiği

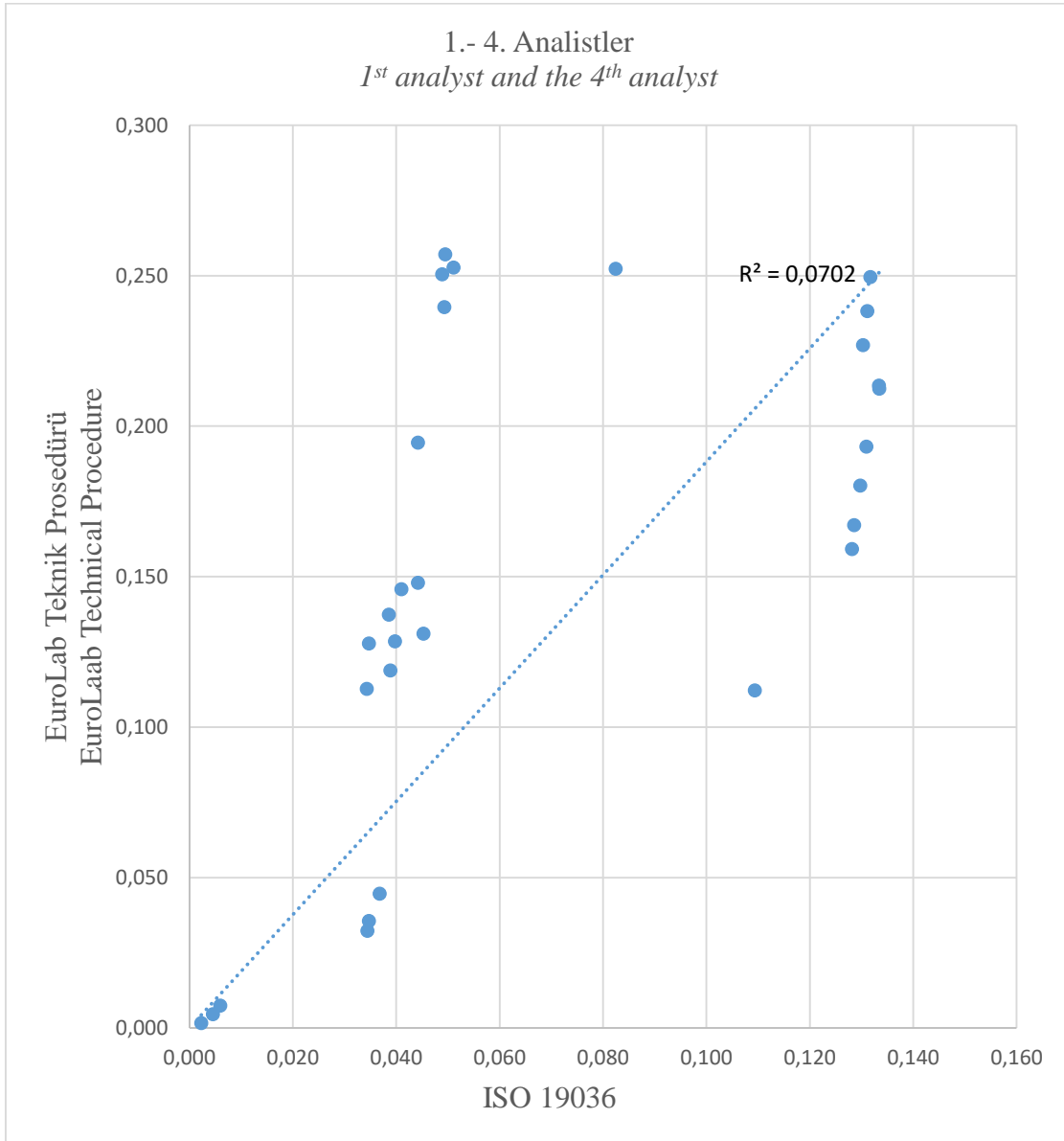
*R: Regression coefficient

Figure 1. Graph showing relationship between S_R values of the 1st analyst and the 2nd analyst calculated using ISO 19036 value and EuroLab technical Procedure S_R values calculated using formula



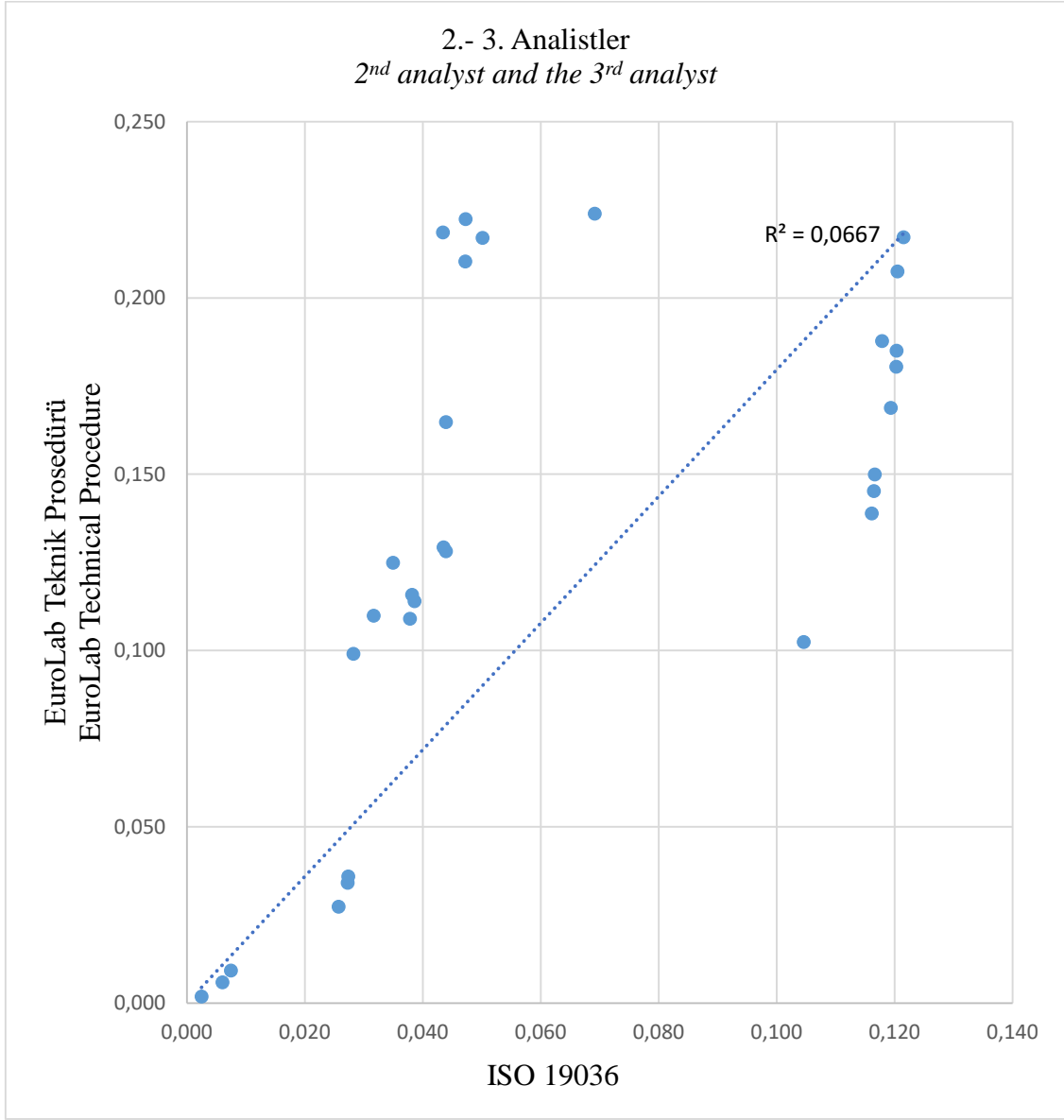
Şekil 2. 1. analist ile 3. analistin ISO 19036 ile hesaplanan S_R değerleri ile EuroLab teknik prosedürü kullanılarak hesaplanan S_R değerleri arasındaki ilişki grafiği

Figure 2. Graph showing relationship between S_R values of the 1st analyst and the 3rd analyst calculated using ISO 19036 value and S_R values calculated using EuroLab technical procedure formula

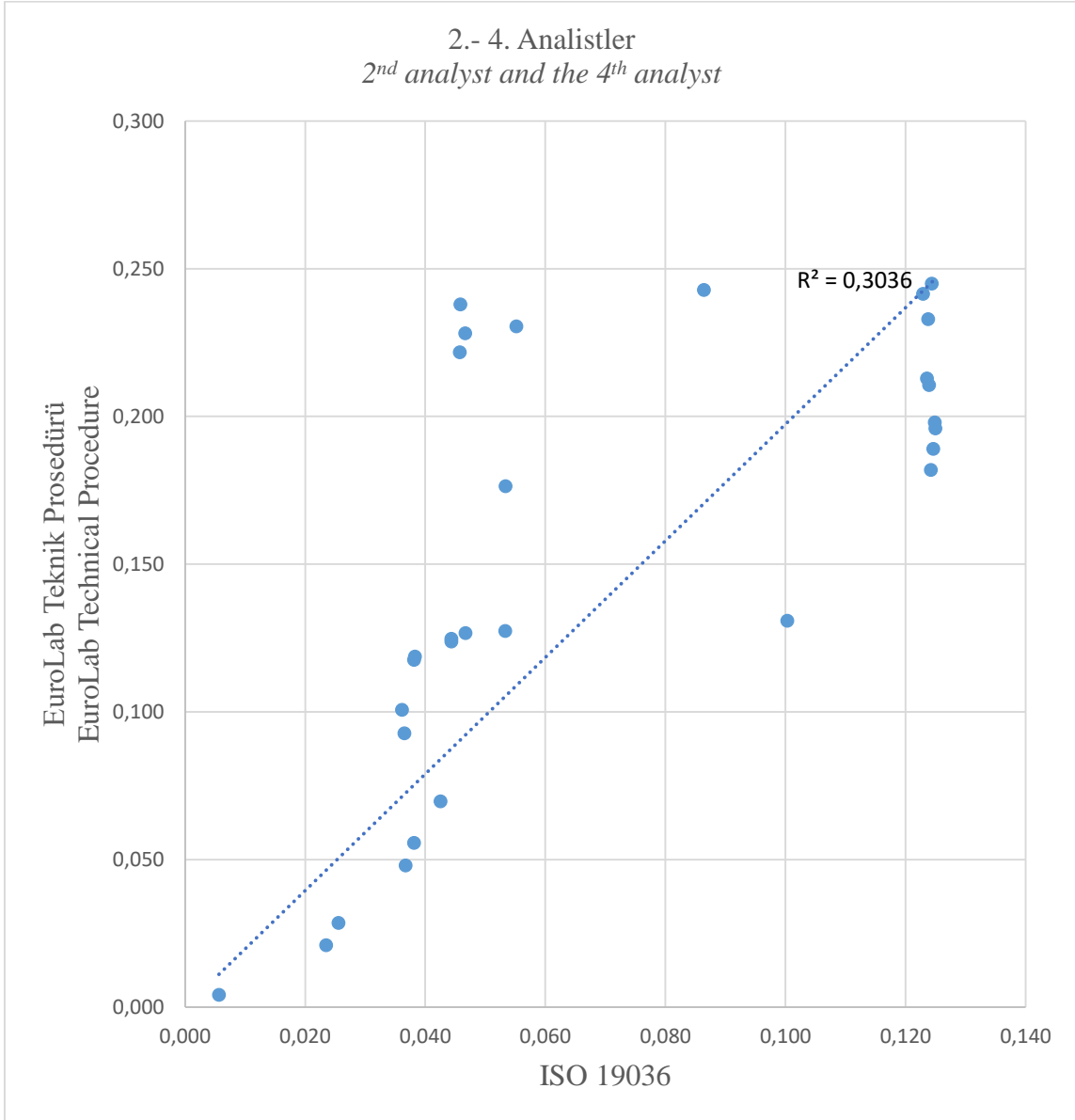


Şekil 3. 1. analist ile 4. analistin ISO 19036 ile hesaplanan S_R değerleri ile EuroLab teknik prosedürü kullanılarak hesaplanan S_R değerleri arasındaki ilişki grafiği

Figure 3. Graph showing relationship between S_R values of the 1st analyst and the 4th analyst calculated using ISO 19036 value and S_R values calculated using EuroLab technical procedure formula

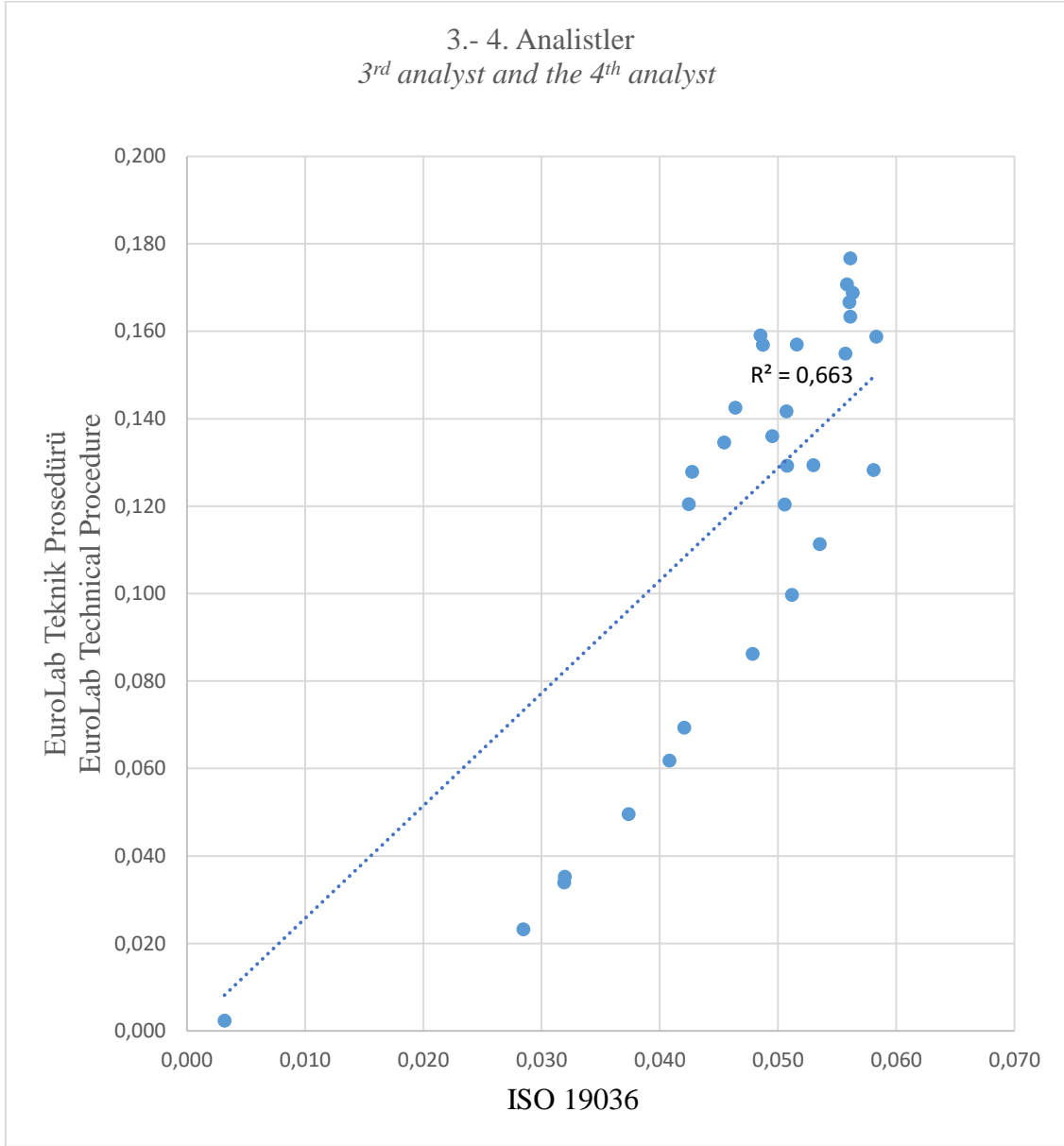


Şekil 4. 2. analist ile 3. analistin ISO 19036 ile hesaplanan S_R değerleri ile EuroLab teknik prosedürü kullanılarak hesaplanan S_R değerleri arasındaki ilişki grafiği
Figure 4. Graph showing relationship between S_R values of the 2nd analyst and the 3rd analyst calculated using ISO 19036 value and S_R values calculated using EuroLab technical procedure formula



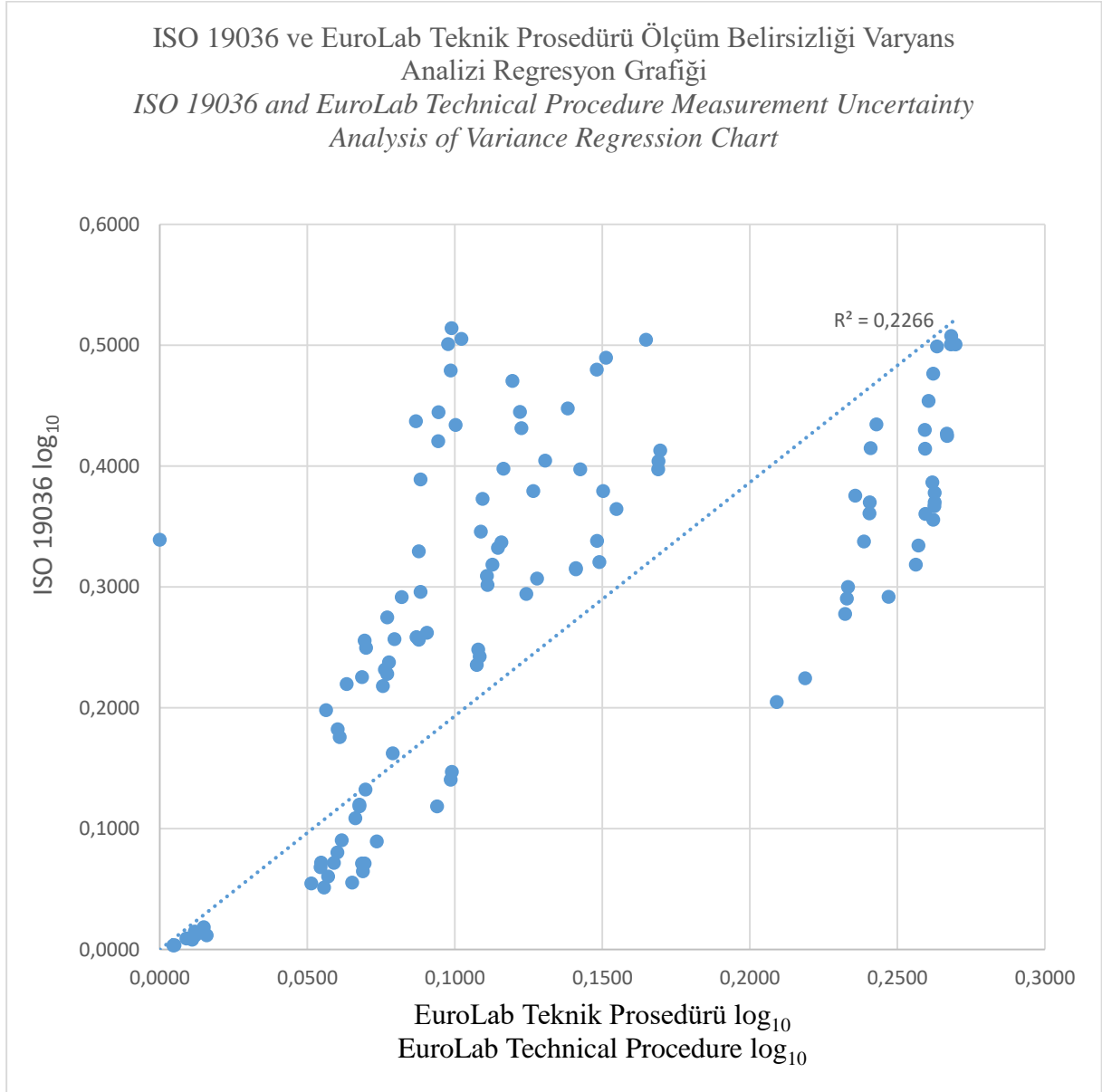
Şekil 5. 2. analist ile 4. analistin ISO 19036 ile hesaplanan S_R değerleri ile EuroLab teknik prosedürü kullanılarak hesaplanan S_R değerleri arasındaki ilişki grafiği

Figure 5. Graph showing relationship between S_R values of the 2nd analyst and the 4th analyst calculated using ISO 19036 value and S_R values calculated using EuroLab technical procedure formula



Şekil 6. 3. analist ile 4. analistin ISO 19036 ile hesaplanan S_R değerleri ile EuroLab teknik prosedürü kullanılarak hesaplanan S_R değerleri arasındaki ilişki grafiği

Figure 6. Graph showing relationship between S_R values of the 3rd analyst and the 4th analyst calculated using ISO 19036 value and S_R values calculated using EuroLab technical procedure formula



Şekil 7. Tüm verilerin ISO 19036 ile hesaplanan S_R değerleri ile EuroLab teknik prosedürü ile hesaplanan S_R değerleri arasındaki ilişki grafiği

Figure 7. Graph showing relationship between S_R values of all data calculated using ISO 19036 and S_R values calculated with EuroLab technical procedure

Çizelge 4. 1. ve 2. analistlerin ISO 19036, EuroLab teknik prosedürü ve NMKL No.8'e ait ölçüm belirsizliği karşılaştırmaları

Table 4. Comparison of measurement uncertainty of 1st analyst and the 2nd analyst about of the ISO 19036, EuroLab technical procedure, and NMKL No.8

	Yemek (<i>B. cereus</i>)	Peynir (<i>E. coli</i>)	Süt (Toplam Mezofilik Aerobik Koloni)
NMKL (1-2)	2.98	2.85	2.85
ISO 19036 (1-2)	0.13	0.11	0.05
EuroLab Teknik Prosedür (1-2)	0.38	0.27	0.08

Çizelge 5. 1. ve 3. analistlerin ISO 19036, EuroLab teknik prosedürü ve NMKL No.8'e ait ölçüm belirsizliği karşılaştırmaları

Table 5. Comparison of measurement uncertainty of 1st analyst and the 3rd analyst about of the ISO 19036, EuroLab technical procedure, and NMKL No.8

	Yemek (<i>B. cereus</i>)	Peynir (<i>E. coli</i>)	Süt (Toplam Mezofilik Aerobik Koloni)
NMKL (1-3)	3.00	2.86	2.83
ISO 19036 (1-3)	0.12	0.21	0.14
EuroLab Teknik Prosedür (1-3)	0.32	0.45	0.19

Çizelge 6. 1. ve 4. analistlerin ISO 19036, EuroLab teknik prosedürü ve NMKL No.8'e ait ölçüm belirsizliği karşılaştırmaları

Table 6. Comparison of measurement uncertainty of 1st analyst and the 4th analyst about of the ISO 19036, EuroLab technical procedure, and NMKL No.8

	Yemek (<i>B. cereus</i>)	Peynir (<i>E. coli</i>)	Süt (Toplam Mezofilik Aerobik Koloni)
NMKL (1-4)	2.98	2.90	2.78
ISO 19036 (1-4)	0.08	0.20	0.12
EuroLab Teknik Prosedür (1-4)	0.29	0.46	0.14

Çizelge 7. 2. ve 3. analistlerin ISO 19036, EuroLab teknik prosedürü ve NMKL No.8'e ait ölçüm belirsizliği karşılaştırmaları

Table 7. Comparison of measurement uncertainty of 2nd analyst and the 3rd analyst about of the ISO 19036, EuroLab technical procedure, and NMKL No.8

	Yemek (<i>B. cereus</i>)	Peynir (<i>E. coli</i>)	Süt (Toplam Mezofilik Aerobik Koloni)
NMKL (2-3)	3.00	2.78	2.86
ISO 19036 (2-3)	0.07	0.18	0.11
EuroLab Teknik Prosedür (2-3)	0.26	0.40	0.13

Mikrobiyolojik analizlerde ölçüm belirsizliği metotlarının karşılaştırılması

Çizelge 8. 2. ve 4. analistlerin ISO 19036, EuroLab teknik prosedürü ve NMKL No.8'e ait ölçüm belirsizliği karşılaştırmaları

Table 8. Comparison of Measurement Uncertainty of 2nd analyst and the 4th analyst about of the ISO 19036, EuroLab technical procedure, and NMKL No.8

	Yemek (<i>B. cereus</i>)	Peynir (<i>E. coli</i>)	Süt (Toplam Mezofilik Aerobik Koloni)
NMKL (2-4)	2.97	2.82	2.80
ISO 19036 (2-4)	0.08	0.19	0.12
EuroLab Teknik Prosedür (2-4)	0.26	0.45	0.18

Çizelge 9. 3. ve 4. analistlerin ISO 19036, EuroLab teknik prosedürü ve NMKL No.8'e ait ölçüm belirsizliği karşılaştırmaları

Table 9. Comparison of measurement uncertainty of 3rd analyst and the 4th analyst about of the ISO 19036, EuroLab technical procedure, and NMKL No.8

	Yemek (<i>B. cereus</i>)	Peynir (<i>E. coli</i>)	Süt (Toplam Mezofilik Aerobik Koloni)
NMKL (3-4)	3.00	2.82	2.79
ISO 19036 (3-4)	0.09	0.10	0.07
EuroLab Teknik Prosedür (3-4)	0.28	0.30	0.11

Tüm veriler varyans analizi ile değerlendirildiğinde ise (Şekil 7) ISO 19036 ve EuroLab Teknik Prosedürü düşüncesi ile gerçekleştirilen ölçüm belirsizliği hesaplamaları için bağıl standart sapma kullanılmaktadır. Bu nedenle, belirsizlik sonuçları çalışmayı da destekler şekilde oldukça düşük olarak elde edilmiştir. Ancak, NMKL No.8'de tüm verilerin ortalamaları bir potada hesaplanmakta ve doğal olarak tıpkı bu çalışmada olduğu gibi ölçüm belirsizliği sonuçları yüksek olarak elde edilmektedir. Araştırma sonuçlarına göre NMKL No. 8 metodunda tüm matriks ve analizlerde birbirine oldukça yakın ancak diğer metotlara kıyasla daha yüksek ölçüm belirsizliği elde edilmiş; süt matriksi (heterojen özelliği nedeniyle) ile çalışılan toplam mezofilik aerobik mikroorganizma sayısının EuroLab Teknik Prosedüründe ise en düşük ölçüm belirsizliğine sahip olduğu ortaya konulmuştur.

ISO 19036 standardına göre petrilerde 10 koloni ve aşağı sayıda mikroorganizma metot için başarılı sonuçlar vermemekte (ISO, 2019; Yılmaz vd.,

2019; ISO, 2021), bu durumlarda EuroLab teknik prosedürü ile hesaplama tekniği araştırmacı tarafından önerilmektedir (Torlak, 2012).

Araştırmaya benzer şekilde, Torlak (2012) peynirde *Staphylococcus aureus* üzerine yaptığı çalışmalarında ISO 19036 ile ölçüm belirsizliği sonucunu $U(\log_{10}) = 0.23$ olarak EuroLab teknik prosedürüne göre belirsizliği ise $U = \%60$ olarak ortaya koymuştur. Araştırmacı, $\%45-75$ aralıkta ölçüm belirsizliği verilerinde EuroLab teknik prosedürünün sonuçları log'a çevirmeden rahatlıkla kullanılabileceğini, limit değer olan $\%75$ ve üzerindeki belirsizlik durumlarında ise ISO yaklaşımının kullanımının gerekliliğini belirtmiştir.

Blasi vd. (2013), yaptıkları validasyon ve ölçüm belirsizliği çalışmalarında ISO 19036 metodu ile yukardan aşağıya (Top down) tüme varım yöntemi olan global yaklaşımın başarılı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Jarvis (2015), mikrobiyologların mikrobiyolojik analizlerde ölçüm belirsizliği çalışmaları için

genellikle sonuçların \log_{10} 'a çevirerek kullandıklarını, koloni sayısı <100 kob/g'dan daha düşük olan analiz sonuçlarında belirsizlik hesabı için poisson dağılımı gerçekleştirildiğini belirtmiştir. Norli (2017), yaptığı çalışmada ISO 19036 ile NMKL metotlarına ait ölçüm belirsizliklerinin aynı olduğunu bildirmiştir.

Tıpkı araştırmada olduğu gibi Yılmaz vd. (2019), NMKL prosedürünün ISO/TS 19036'ya göre yapılan hesaplamaların bünyesinde sunduğu metoda göre tüm değişkenlerin değerlendirmeye katılmaması nedeniyle daha düşük sonuçlar alındığını belirttiğini; ancak karşılaştırma sonuçlarında ara kesinliğin ortaya konulmasında gerçekte tüm alanlarda karşılaşılabilecek değişikliklerin analize yansıtıldığının görülmesinin öneminin olduğunu ve uygulamanın ISO/TS 19036'nın A ve B koşulları ve diğer tüm değişiklik uygulamaları ile sağlandığını, tüm bu değişikliklerin NMKL prosedür uygulamasına yansıtıldığında ise prosedürde belirtilen değerlendirmenin oluşmasının beklenmemesi gerektiğini belirtmişlerdir.

SONUÇ

Mikrobiyolojik analizlerin raporlanmasında ölçüm belirsizliği hesaplamaları büyük oranda kullanılmamakla beraber numune sonuçlarının uygunsuzluğu durumunda müşterinin istekleri doğrultusunda analiz raporlarında belirtilmek durumunda kullanılabilir.

NMKL yaklaşımında çoğunlukla tekrarlanabilirlik çalışmasından gelen değişkenlik de hesaplama katılmaktadır. Bu nedenle ISO yaklaşımından daha yüksek bir standart sapma elde edilmesi olasıdır (Yılmaz vd., 2019). Bununla birlikte ISO yaklaşımı ve EuroLab Teknik Prosedürü, aynı gıda grubu içinde değişik numunelerde çalışmayı sağlamaya ve tekrarüretilebilirlik koşullarında iki paralel olarak çalışılması halinde daha hassas sonuçlar vermeye elverişli metotlardır.

Düşük mikroorganizma yükü var ise bileşen yani ISO 19036 yaklaşımı daha doğrudur. Çalışılan örneklerde heterojenlik fazla ise ISO 19036 metodundan sonra tercih edilecek en yakın yaklaşım EuroLab Teknik Prosedürüdür. Eğer, ortam koşullarının, donanım, matriks vb. tüm

değiştirilebilecek unsurların değiştirilerek analizlerin gerçekleştirilmesi ve bir ölçüm belirsizliği ortaya konulmak isteniyorsa ISO 19036 standardı tercih edilmelidir. Gerçekleştirilen çalışma ile istatistiki olarak ISO 19036 metodu ile karşılaştırılan sonuçların EuroLab Teknik Prosedürüne göre, ISO 19036 ve EuroLab Teknik Prosedürünün ise NMKL No.8 standardına göre daha hassas aralıkta ölçüm belirsizliği sonucu ortaya koyduğu belirlenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada görüşlerini esirgemeyen Prof. Dr. Emrah Torlak ile Dr. Erdem Danyer'e teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

Blasi, G., Petruzzelli, A., Ottaviani, D., Fisichella, S., Raimo, E.D., Valiani, A., Capuccella, M., Scuota, S., Haouet, M. N. (2013). Assessment of reproducibility and uncertainty of food microbiology methods: statistical approach of a multi-site Laboratory. *Accred Qual Assur*, 18, 143–148.

Corry, J. E. L., Jarvis, B., Passmore, S., Hedges, A. (2007). A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. *Food Microbiol*, 24, 230–253.

Dereani, V. R., Sarić, M. M. (2010). Validation and measurement uncertainty estimation in food microbiology: differences between quantitative and qualitative methods. *Validation and Measurement in Food Microbiol*, 60 (3): 207–213.

EuroLab Technical Report No.1 (2007). Measurement uncertainty revisited: alternative approaches to uncertainty test results and the uncertainty of evaluation. https://eurolab-d.de/files/measurement_uncertainty_revisited__alternative_approaches_to_uncertainty_evaluation.pdf

Eurachem Guide (2013). Accreditation for microbiological laboratories. www.eurachem.org/

- images/stories/Guides/pdf/Eurachem_Guide_AML_2013.
- Forster, L. I. (2003). Measurement uncertainty in microbiology. *J AOAC Int*, 86 (5): 1089-1094.
- Gašljević, V. (2004). Validacija mikrobioloških metoda. Seminar Hrvatskog mjeriteljskog društva, Materijali, 1. izdanje (05/2004).
- ISO (2017b). Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation. ISO 21748: 2017
- ISO (2019). Microbiology of the food chain – Guidelines for the estimations of measurement uncertainty for quantitative determinations. ISO 19036: 2019
- ISO (2021). Microbiology of the food chain- Method validation- Part:3. Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. ISO 16140-3: 2021
- Jarvis, B., Hedges, A. J., Corry, J. E. L. (2007). Assessment of measurement uncertainty for quantitative methods of analysis: Comparative assessment of the precision (uncertainty) of bacterial colony counts. *Int J Food Microbiol*, 116, 44–51.
- Jarvis, B. (2015). Statistical aspects of the microbiological examination of foods. Chapter 11. Estimation of measurement uncertainty. 3rd edition. ISBN:978-0-12-803973-1.
- JCGM 200 (2012). International Vocabulary of Metrology. Basic and general concepts and associated terms. 3rd edition. *VIM*, 2008.
- Lombard, B. (2006). Estimation of measurement uncertainty in food microbiology: The ISO approach. *Accred Qual Assur*, 17, 94–100.
- NordVal International (NMKL) Procedure No. 8 (2004). Measurement of uncertainty in quantitative microbiological examination of foods. 4th Edition.
- NordVal International (NMKL) Procedure No. 32 (2017). Verification of microbiological methods.
- Norli, H. S. (2017). Measurement Uncertainty in Microbiological Examination of Foods. Eurachem –AOAC Europe Workshop. Norwegian Veterinary Institute.
- Torlak, E. (2012). Alternative calculation of measurement uncertainty with global approach in food microbiology. *Accred Qual Assur*, 17, 597–601.
- TS EN ISO (2017a). Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar (18. 12. 2017). TS EN ISO/IEC 17025: 2017
- TS/ ISO (2000). Ölçme Metotlarının ve Sonuçlarının Doğruluğu (Gerçeklik ve Kesinlik)- Bölüm 3: Standard Bir Ölçme Metodunun Kesinliğinin Ara Ölçmeleri (Kasım, 2000). TS 5822-3 ISO 5725-3: 2000
- TÜRKAK (2015). Deney/analiz sonuçlardaki ölçüm belirsizliği tahmini için TÜRKAK prensipleri. Türk Akreditasyon Kurumu Rehberi (09.07.2015).
- TÜRKAK (2019). Metodun Geçerli Kılınması ve Doğrulanması İçin Bilgilendirme Kılavuzu.
- Yılmaz, A., Yıldırım, G., Çakmak Sancar, B., Yolcu Ömeroğlu, P. (2019). Mikrobiyolojik Analizlerde Metotların Doğrulanması ve Geçerli Kılınması. *Gıda Mikrobiyolojisi*, Halkman, A. K. (ed.), Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd, Şti, Ankara, Türkiye, s.687, ISBN:978-605-45-683-5.



**ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON PARAMETRELERİNİN
KUŞBURNU (*ROSA CANINA L.*) MEYVESİNİN TOPLAM FENOLİK VE
KAROTENOİD MİKTARLARI İLE ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ ÜZERİNE
ETKİSİ***

Semra Turan**, Derya Atalay, Rukiye Solak, Meliha Özoğul, Melek Demirtaş
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

Geliş / Received: 12.03.2021; Kabul / Accepted: 24.04.2021; Online baskı / Published online: 10.05.2021

Turan, S., Atalay, D., Solak, R., Özoğul, M., Demirtaş, M. (2021). Ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin kuşburnu (*Rosa canina L.*) meyvesinin toplam fenolik ve karotenoid miktarları ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi. *GIDA* (2021) 46 (3) 726-738 doi: 10.15237/gida. GD21051.

Turan, S., Atalay, D., Solak, R., Özoğul, M., Demirtaş, M. (2021). Effects of ultrasound-assisted extraction parameters on the total phenolics and carotenoid content and antioxidant activity of rosehip (*Rosa Canina L.*). *GIDA* (2021) 46 (3) 726-738 doi: 10.15237/gida. GD21051.

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, ultrasonik ekstraksiyon parametrelerinden sonikasyon süresi (3, 6, 9, 12 ve 15 dakika), genlik (%25, 50 ve 100), sıcaklık (20, 30 ve 40°C) ve çözücü:meyve ezmesi oranlarının (5, 10 ve 15 mL/g) kuşburnunun toplam fenolik ve karotenoid miktarları üzerine etkisini belirlemektir. Ultrasonikasyon süresi artırıldığında toplam fenolik madde miktarı 3.18 mg/g değerinden 4.51 mg/g değerine; toplam karotenoid miktarı ise 4.29 mg/kg değerinden 18.70 mg/kg değerine yükselmiştir. Ultrasonikasyon genliğinin toplam karotenoid miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) olup, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite üzerine etkisi anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$). Sıcaklığın artırılması toplam fenolik madde miktarında istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) değişime neden olurken, toplam karotenoid miktarı ve antioksidan aktivite üzerine etkisi anlamlı olmamıştır ($P > 0.05$). Diğer taraftan, ultrasonik ekstraksiyon sırasında çözücü:meyve ezmesi oranının artırılması daha fazla karotenoidin ekstraksiyonunu sağlamıştır. Elde edilen sonuçlara göre, ultrasonik ekstraksiyon yönteminin kuşburnu meyvesindeki biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda başarıyla kullanılabileceği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ultrasonik ekstraksiyon, kuşburnu, antioksidan aktivite, toplam fenolik madde, toplam karotenoid miktarı

* Bu çalışmanın bir kısmı 05-07 Ekim 2016 tarihinde Edirne’de düzenlenen Türkiye 12. Gıda Kongresinde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

** Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: turan_s@ibu.edu.tr

☎: (+90) 374 254 1000 /4830

☎: (+90) 374 253 4558

Semra Turan; ORCID no; 0000-0002-1005-3590

Derya Atalay; ORCID no; 0000-0003-4536-7239

Rukiye Solak; ORCID no; 0000-0001-5171-7587

Meliha Özoğul; ORCID no; 0000-0002-8534-4819

Melek Demirtaş; ORCID no; 0000-0003-3117-3804

EFFECTS OF ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION PARAMETERS ON THE TOTAL PHENOLIC AND CAROTENOID CONTENTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROSEHIP (*ROSA CANINA L.*)

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effects of the ultrasonic extraction parameters such as sonication times (3, 6, 9, 12 and 15 minutes), amplitude (25, 50 and 100), temperature (20, 30 and 40 °C), and solvent:fruit paste ratios (5, 10 and 15 mL/g) on the total phenolic and total carotenoid contents of rosehip. The total phenolic content increased from 3.18 mg/g to 4.51 mg/g and the total carotenoid content increased from 4.29 mg/kg to 18.70 mg/kg as the ultrasonication time increased. While the effect of ultrasonication amplitude on total carotenoid content was significant ($P < 0.05$), its effect on the total phenolic content and antioxidant activity was found insignificant ($P > 0.05$). Increasing the temperature caused a significant ($P < 0.05$) change in the total phenolic content, while its effect on the total amount of carotenoid and antioxidant activity was insignificant ($P > 0.05$). On the other hand, increasing the solvent:fruit paste ratio provided extraction of more carotenoids. According to the results of the study, it has been determined that the ultrasonic extraction method can be used successfully in the extraction of bioactive compounds of rosehip.

Key words: Ultrasound extraction, rosehip, antioxidant activity, total phenolic compound, total carotenoid content

GİRİŞ

Karakteristik çiçeklere ve meyvelere sahip olan *Rosaceae* familyasına ait kuşburnu (*Rosa canina L.*), genellikle Avrupa, Asya, Orta Doğu ve Kuzey Amerika'da yetişmekte olan bir türdür (Duru vd., 2011; İlbaý vd., 2013a; Demir vd., 2014; Patel 2017; Mannozi vd., 2020; Milić vd., 2020). Anadolu, kuşburnu türlerinin başlıca genetik çeşitlilik alanlarından biridir ve Türkiye'nin Doğu ve İç Anadolu bölgeleri yerli kuşburnu popülasyonu açısından oldukça zengindir (Demir vd., 2014). Kuşburnu meyvelerinin çay, reçel, şurup, çorba, pestil, meyve suyu ve marmelat gibi ürünlerde kullanılmasının yanı sıra farmakolojik olarak da kullanımı yaygındır (Duru vd., 2011; İlbaý vd., 2013a; Demir vd., 2014; Patel, 2017; Atalar vd., 2020). Bu bitki fenolikler, flavonoidler, C vitamini, karotenoidler, tokoferol ve esansiyel yağ asitleri gibi birçok bileşik açısından zengin olduğundan antioksidan özellik göstermekte, grip, enfeksiyon ve iltihaplı hastalık tedavilerinde kullanılmaktadır (Duru vd., 2011; İlbaý vd., 2013a; İlbaý vd., 2013b; Demir vd., 2014; Fan vd., 2014; Patel 2017; Atalar vd., 2020; Mannozi vd., 2020; Milić vd., 2020). Kuşburnunun bileşiminde bulunan bu fitokimyasallar, serbest radikalleri inhibe etmekte ve hücreleri oksidatif stresten korumaya yardımcı olarak antioksidan özellik göstermektedir (Duru vd., 2011; İlbaý vd., 2013a). Oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklar, kanser,

alerji, diyabet ve depresyon gibi çeşitli hastalıkların altında yatan neden olarak bilinmektedir. Antioksidanlar, oksidatif strese neden olan faktörleri elimine ederek bu hastalıkları önlemektedir. ABTS radikallerini süpürme, bakır iyonlarını indirgeme ve lipit peroksidasyonunun inhibisyonu gibi testler antioksidan özellikleri belirlemek için uygulanan standart testlerden bazılarıdır (İlbaý vd., 2013b; Patel, 2017).

Bitki matrikslerinden bazı bileşenlerin elde edilmesinde, ekstraksiyon yönteminin uygulandığı bilinmektedir (Esclapez vd., 2011; İlbaý vd., 2013b). Ekstrakte edilen biyoaktif bileşikler gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Ekstraksiyon işleminde daha kısa süre uygulama ve düşük maliyet gibi faktörler önemli olmakta; bu durum da farklı ekstraksiyon yöntemlerinin yaygınlaşmasını hızlandırmaktadır (Esclapez vd., 2011). Son yıllarda dikkat çeken ultrason destekli ekstraksiyon, geleneksel yöntemlerden daha az zaman, enerji ve çözücü gerektiren yenilikçi bir teknik olarak bilinmekte; ayrıca ısıya duyarlı bileşikler için faydalı olan orta düzeydeki sıcaklıkların kullanımını mümkün kılmaktadır (Esclapez vd., 2011; İlbaý vd., 2013b; Şahin vd., 2020; Ez Zoubi vd., 2021).

Ultrason katı, sıvı veya gaz ortamda mekanik titreşim düzeyi 20 kHz'den yüksek frekansa sahip

bir tür ses dalgasıdır (Wong vd., 2019; Şahin vd., 2020). Öncelikle mekanik titreşimler, mekanik basınç dalgalarına dönüştürülerek enerjiyi ortama aktarmakta; sonra ortam enerjiyi dalga ile temas halinde olan malzemeye taşımaktadır (Şahin vd., 2020). Ultrason destekli ekstraksiyonda, bitkisel dokuların hücre duvarları zarar görerek dokudaki çözünen maddenin çözücü içerisine dağılması kolaylaşmakta ve bununla birlikte maddelerin çözücüye transferi artmaktadır (İlbaý vd., 2013a; Wong vd., 2019; Şahin vd., 2020). Bu ekstraksiyon yönteminde uygulanan ultrasonik güç, frekans, sıcaklık, süre ve çözücü seçimi gibi birçok faktör önemlidir (Escalpez vd., 2011). Önceki yapılan çalışmalarda, hem kuşburnunun farklı yöntemlerle ekstraksiyonu (Wenzig vd., 2008; Lattanzio vd., 2011; İlbaý vd., 2013a) hem de ultrason destekli farklı bitki ve meyvelerin ekstraksiyonu (Jabbar vd., 2014; Wong vd., 2019; Şahin vd., 2020; Ez Zoubi vd., 2021) ile ilgili çeşitli araştırmalar bulunmaktadır.

İlbaý vd. (2013a) kuşburnundan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda optimum ultrasonik ekstraksiyon koşullarını 81.23 dakika sonikasyon süresi, 50°C sıcaklık ve %40 oranında etanol olarak belirlemişlerdir. Atalar vd., (2020) ise kuşburnu nektarında sedimentasyon problemini önlemek için farklı genlik ve sürelerde sonikasyon uygulamışlardır. Literatürde, kuşburnu meyvesinin ultrason destekli ekstraksiyonunda farklı süre, genlik, sıcaklık ve çözücü:meyve oranlarının birlikte incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, kuşburnu meyvesinin ultrason destekli ekstraksiyon ile farklı süre (3, 6, 9, 12 ve 15 dakika), genlik (%25, 50 ve 100), sıcaklık (20, 30 ve 40°C) ve çözücü:meyve ezmesi oranlarında (5, 10 ve 15 mL/g) ekstrakte edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen ekstraktlarda kuşburnu meyvesinde önemli miktarda bulunan toplam fenolik ve karotenoid miktarları ile antioksidan aktivitesi incelenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Kuşburnu meyveleri Bolu'daki bir semt pazarından temin edilmiştir. Ultrasonik ekstraksiyonlar yapılabildiği kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir. Ultrasonik prob kullanılarak

hazırlanan ekstraktlar analizler yapılabildiği kadar -18 °C'de bekletilmiştir.

Metot

Kuşburnu meyveleri yıkanıp, çekirdekleri ayrılmış ve meyve eti kahve değirmeni ile ezilerek pulp haline getirilmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon öncesinde 10 g tartılarak üzerine 100 mL metanol eklenmiştir. Farklı ultrasonikasyon süreleri (3, 6, 9, 12 ve 15 dakika), genlik (%25, 50 ve 100), sıcaklık (20, 30 ve 40°C) ve çözücü:meyve ezmesi oranları (5, 10 ve 15 mL/g) uygulanarak biyoaktif bileşikler ekstrakte edilmiştir. Bu amaçla prob tipi ultrasonik homojenizatör (Bandelin-GM 3200, Berlin, Almanya) kullanılarak kuşburnunun ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sırasında parametrelerden biri değiştirilirken, diğerleri sabit tutulmuştur. Sabit tutulan koşullar 10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 12 dakika ultrasonikasyon süresi, 20°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı şeklinde olmuştur. Ultrasonik ekstraksiyon işlemi sonrası kap içeriği 50 mL'lik santrifüj tüplerine aktararak 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstteki sıvı kısım alınıp, katı kısmın üzerine 50 mL metanol eklenerek tekrar santrifüj edilmiştir. Üst fazlar birleştirildikten sonra çözücünün bir kısmı döner buharlaştırıcı kullanılarak düşük basınç altında uzaklaştırılmıştır. Kalan alkollü ekstrakt 25 mL'lik balon jöjeye aktararak çizgisine kadar metanol ile tamamlanmıştır.

Kuru madde tayini

Kuşburnu meyve ezmesinin kuru madde miktarı AOAC Metot 925.10 (1990)'da belirtilen metoda göre belirlenmiştir.

Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu (Shahidi vd., 2001) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu metot fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu ayırıcını indirgediği ve oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Ekstraktlar belirli oranlarda seyreltildikten sonra seyreltilmiş ekstraktan 0.5 mL alınmış ve bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 7 mL saf su eklenmiştir. Ardından 0.5 mL Folin-

Cioaltea ayracı ilave edilmiş ve 3 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda 2 mL %20'lik sodyum karbonat eklenmiştir. 1 saat karanlıkta bekletildikten sonra, UV-görünür spektrofotometrede (Shimadzu UV 1700, Japonya) 720 nm'de şahit denemeye karşı absorbans değerleri okunmuştur. Şahit denemede örnek yerine 0.5 mL metanol kullanılmıştır. 20-140 mg/L konsantrasyon aralığındaki gallik asit standart çözeltileri kullanılarak aynı koşullarda analiz gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan kalibrasyon eğrisinin denklemi $y = 0.0054x + 0.0188$ ($R^2 = 0.999$) şeklinde belirlenmiştir. Kalibrasyon eğrisinin denkleminde yararlanılarak toplam fenolik madde miktarı kuru maddede mg gallik asit eşdeğeri/g kuşburnu ezmesi şeklinde verilmiştir.

Toplam karotenoid miktarının belirlenmesi

Ultrasonik ekstraksiyon ile hazırlanan kuşburnu örneklerinin toplam karotenoid miktarı Martínez-Flores vd. (2015)'nin uyguladığı metoda göre spektroskopik olarak belirlenmiştir. Hazırlanan ekstraktlardan 1 mL alınarak üzerine 5 mL metanol:kloroform çözeltisi (1:2, v/v) eklenmiştir. Ardından 0.5 mL doymuş sodyum klorür çözeltisi eklenerek iyice çalkalanmış ve faz ayrımı oluşuncaya kadar bekletilmiştir. Üst faz pastör pipeti ile uzaklaştırıldıktan sonra kloroform fazına bir miktar sodyum sülfat eklenmiş ve 4000 rpm devir hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazdan 1 mL alınarak üzerine 5 mL metanol:kloroform (1:2, v/v) eklenmiştir. UV-görünür spektrofotometrede (Shimadzu UV 1700, Japon) 450 nm'de metanol:kloroform (1:2, v/v) çözücü karışımına karşılık absorbans okunmuştur. 1-12 mg/L konsantrasyon aralığındaki β -karoten standart çözeltileri kullanılarak denklemi $y = 0.0873x - 0.0234$ ($R^2 = 0.996$) olan kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Kuşburnu ezmesindeki toplam karotenoid miktarı kuru maddede mg β -karoten eşdeğeri/kg şeklinde hesaplanmıştır.

Troloks eşdeğeri antioksidan aktivite tayini

ABTS yöntemi uygulanarak ultrasonik ekstraksiyon uygulanan örneklerin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir (Re vd., 1999). Bu yöntem ABTS radikal çözeltisi üzerine eklenen

antioksidan içeren ekstraktın radikali indirgemesi esasına dayanmaktadır. Aktif ABTS radikali hazırlandıktan sonra 1:80 (v/v) oranında metanol ile seyreltilmiş ve 734 nm'deki absorbansı 0.700 değerine ayarlanmıştır.

Analiz sırasında 990 μ L seyreltilmiş ABTS radikali üzerine 10 μ L seyreltilmiş örnek eklenmiştir. 6 dakika boyunca sonunda 734 nm'de okunan absorbans değerleri ölçülmüş ve süre sonundaki absorbans değeri kaydedilmiştir. Aynı işlemler kontrol deneme için de gerçekleştirilmiştir. Örnek ve kontrol için okunan absorbans değerlerinden yararlanılarak aşağıdaki denkleme göre % inhibisyon oranları hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) * 100 / A_{\text{kontrol}} \quad (1)$$

990 μ L ABTS radikali üzerine 10 μ L 2.5, 5, 10, 15 ve 20 mM konsantrasyonlardaki Troloks standart çözeltileri eklenmiş ve 6 dakika sonunda absorbans değerleri kaydedilmiştir. Konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu grafiğinden denkleminde ($y = 28.8x + 8.2036$, $R^2 = 0.995$) yararlanılarak kuşburnu ezmesinin antioksidan aktivitesi kuru maddede troloks eşdeğeri μ mol/g şeklinde hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Analiz sonuçları SPSS 23 paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalamalar arası farklılık ANOVA testi ile belirlenmiştir. Farklı grupların saptanmasında Duncan testi uygulanmıştır. Denemeler ve analizler iki tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

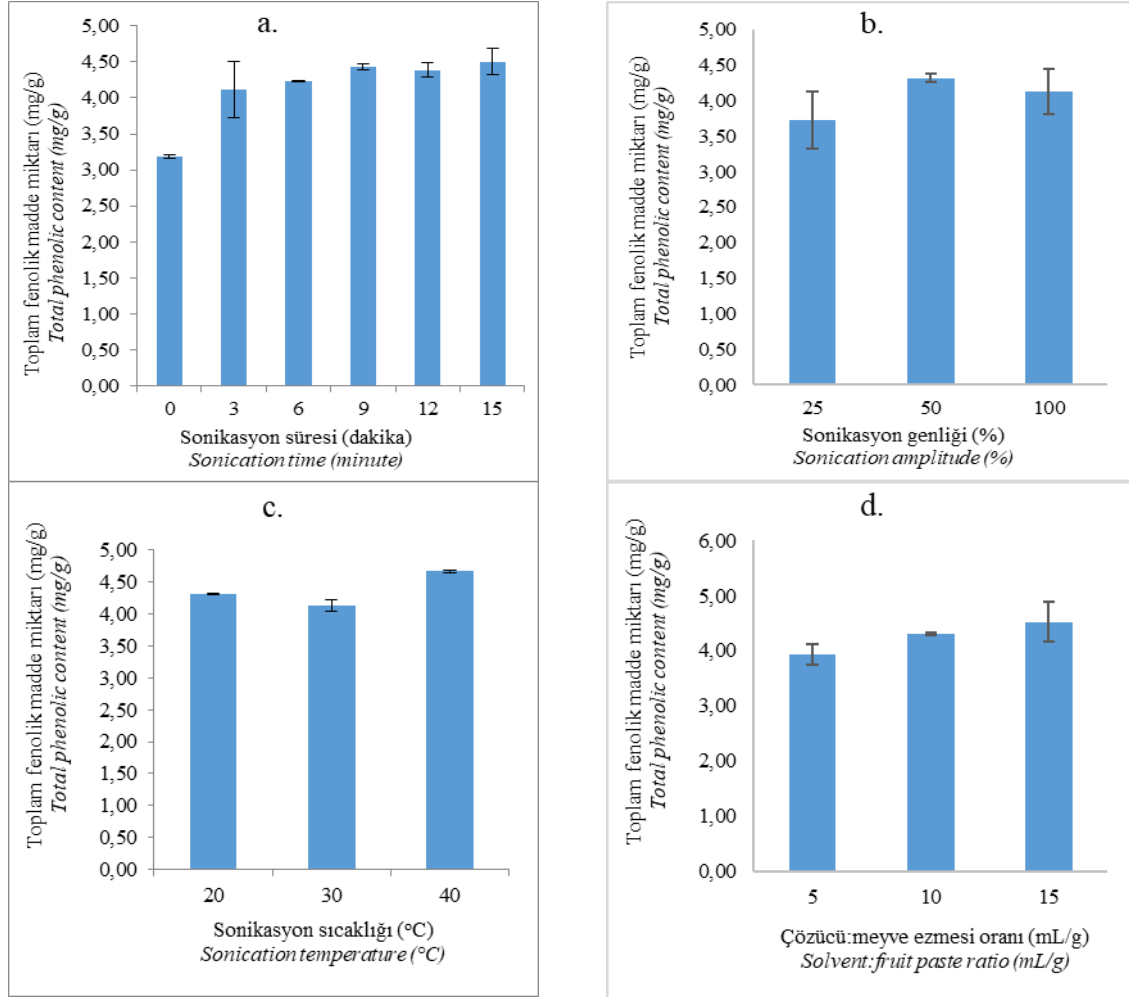
ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Toplam fenolik madde miktarı

Farklı ultrasonikasyon parametrelerinin kuşburnu ezmesindeki toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisi Şekil 1'de gösterilmiştir. Ultrasonikasyon süresi arttıkça toplam fenolik madde miktarının arttığı ($P < 0.05$) görülmektedir (Şekil 1.a). Bu çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde sonikasyon süresinin artırılmasının biyoaktif bileşen miktarını artırdığına ilişkin bulgular literatürde yer almaktadır (İlbağ vd., 2013a; Ciğeroğlu vd., 2017; Algan Cavuldak vd.,

2019; Poyraz vd., 2021). Algan Cavuldak vd. (2019) ultrasonik ekstraksiyon süresi arttıkça bitki materyalinden çözücüye kütle transferinin artacağını, çok uzun süreli ekstraksiyon

uygulanmasının ise fenolik bileşiklerin parçalanmasına neden olabileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 1. Farklı koşullarda ultrasonik ekstraksiyon uygulanan kuşburnu meyvesinin toplam fenolik madde miktarı (mg gallic asit/g KM) (a) Ultrasonikasyon süresinin etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 20°C sıcaklık ve 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı) (b) Ultrasonikasyon genliğinin etkisi (10 g meyve ezmesi, 20°C sıcaklık, 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı, 12 dakika ultrasonikasyon süresi) (c) Ultrasonikasyon sıcaklığının etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı, 12 dakika ultrasonikasyon süresi) (d) Çözücü:meyve ezmesi oranının etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 20°C sıcaklık, 12 dakika ultrasonikasyon süresi)

Figure 1. Total phenolic content of rosehip fruit extracted ultrasonically under different conditions (mg gallic acid/g DW) Effect of ultrasonication time (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 20°C temperature, 5 mL/g solvent:fruit pulp) b) Effect of ultrasonication amplitude (10 g fruit pulp, 20°C temperature, 5 mL/g solvent:fruit pulp, 12 minute ultrasonication time) (c) Effect of ultrasonication temperature (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 5 mL/g solvent/fruit pulp, 12 minute ultrasonication time) (d) Effect of solvent:fruit paste ratio (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 20°C temperature, 2 minute ultrasonication time).

Sonikasyon uygulanmayan kuşburnu ezmesinin toplam fenolik madde miktarı 3.18 mg/g KM olup, 3 dakika ultrases dalgası uygulandığında 4.12 mg/g KM değerine yükselmiştir. 3. dakikadan sonra artış hızı yavaşlamış ve 15 dakika sonunda toplam fenolik madde miktarı 4.51 mg/g KM olarak bulunmuştur. Ancak 3.-15. dakikalar arasında ekstrakte edilen fenolik madde miktarında değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$).

Farklı sonikasyon sürelerinin uygulandığı bir çalışmada Cığeroğlu vd. (2017) sonikasyonun ilk 30 dakikasında hızlı difüzyon nedeniyle narenciye yaprak ekstraktının toplam fenolik madde miktarında keskin bir artış, sonrasında ise daha yavaş bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Belirli bir doygunluk anında ekstraksiyonun dengeye geldiğini; bu nedenle belirli bir ana kadar konsantrasyonun hızlı arttığını, sonrasında artış hızının yavaşladığını bildirmişlerdir. İlbağ vd. (2013a) ise ultrasonik ekstraksiyonun ilk aşaması olan ısıtma aşamasında bitki materyalinin yüzeyinde bulunan bileşenlerin çözündüğünü, ikinci aşama olan yavaş ekstraksiyon aşamasında ise bitki matriksinden bileşiklerin çözücüye kütle transferinin gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle kuşburnu meyvesinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda sonikasyonun ilk 30 dakikasında hızlı, ilerleyen sürelerde ise daha yavaş ekstraksiyon gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada da benzer bir durum gözlenmiştir. Genel olarak sonikasyon süresince hem toplam fenolik madde, hem de toplam flavonoid miktarının arttığı bildirilmiştir (Poyraz vd., 2021). Diğer taraftan Algan Cavuldak vd. (2019) yaptıkları çalışmada ultrasonik ekstraksiyon süresinin dut yaprağındaki toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarları üzerine lineer etkilerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirlemişlerdir ($P > 0.05$). Uzun süreli ekstraksiyonun fenolik ekstraksiyon verimini artırmadığını bildirmişlerdir.

Ultrasonikasyon genliği %25 uygulandığında toplam fenolik madde miktarı 3.73 mg/g KM olup, genlik %50'ye yükseltildiğinde toplam fenolik madde miktarının arttığı (4.32 mg/g KM), ancak toplam fenolik maddedeki değişimin

istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P > 0.05$) gözlenmiştir. %100 genlik uygulandığında ise kuşburnu ezmesinin toplam fenolik madde miktarı (4.12 mg/g KM) bir miktar düşmüştür (Şekil 1.b). Bu durumda %50 düzeyinde ultrases dalgaları uygulanmasının yeterli olduğu düşünülmektedir. Yüksek genlik uygulanması güç sarfiyatını artıracak ve örneğin ısınmasına neden olacaktır. Çeşitli çalışmalarda ultrasonikasyon genliğinin artmasının örnekte ısınmaya neden olduğu bildirilmektedir (Chemat vd., 2017; Jabbar vd., 2014). Ultrason genliğinin artırılması, ultrason gücünün artmasına neden olmakta ve kavitasyon gerçekleşmektedir. Kavitasyon lokal ısınmaya neden olarak bitki hücre duvarının yıkımını sağlamaktadır (Poyraz vd., 2021).

Sonikasyon sıcaklığının artırılması toplam fenolik madde miktarında artış sağlamıştır ($P < 0.05$). 20°C'de sonikasyon uygulandığında toplam fenolik madde miktarı 3.94 mg/g KM iken, 40°C'de 4.52 mg/g KM olarak belirlenmiştir (Şekil 1.c). Sonikasyon sıcaklığının fenolik ekstraksiyon verimi üzerine etkisini inceleyen çalışmalardan birinde, Algan Cavuldak (2019) ultrasonik ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça fenolik bileşiklerin difüzyonunun hızlandığını, çözünenin difüzyon katsayısının arttığını, çözücünün yüzey gerilimi ve çözücü viskozitesinin ise azaldığını; bu nedenlerle de fenolik ekstraksiyon veriminin arttığını bildirmişlerdir. Ancak çok yüksek sıcaklıklarda ise polifenollerin bozulabileceğini belirtmişlerdir. Karadut yaprağından biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda sıcaklıktaki değişimin toplam flavonoid miktarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($P < 0.05$) değiştirdiğini, ancak toplam fenolik madde üzerine etkisinin anlamlı olmadığını ($P > 0.05$) saptamışlardır.

Cığeroğlu vd. (2017) narenciye yapraklarından fenoliklerin ultrasonik ekstraksiyonunda sıcaklık 32°C'den 42°C'ye yükseltildiğinde fenolik madde miktarında hızlı bir artış olduğunu, ancak daha yüksek sıcaklıklarda sıcaklığın artmasının kavitasyon yoğunluğunun azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. İlbağ vd. (2013a) sonikasyon sıcaklığının artmasının kuşburnundan ekstrakte edilen fenolik miktarını artırdığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde sıcaklık artışının

kütle transfer hızını artırdığını, bitki matriksinin aktif bölgeleri tarafından çözücü desorpsiyonunu kolaylaştırdığını ve çözücü buhar basıncını artırdığını belirtmişlerdir.

Çözücü:meyve ezmesinin oranının artırılması ile toplam fenolik madde miktarında artış sağlanmış, ancak değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P >0.05$, Şekil 1.d). Çözücü:meyve ezmesi oranı 5 mL/g olduğunda toplam fenolik madde miktarı 3.94 mg/g KM iken, 15 mL/g düzeyinde 4.52 mg/g KM olarak belirlenmiştir. Çeşitli araştırmalarda ekstraksiyonda kullanılan çözücü oranının artmasının toplam fenolik madde miktarını artırdığı bulunmuştur (Çigeroğlu vd., 2017; Algan Cavuldak vd., 2019; Ez Zoubi vd., 2021). Bu çalışmalarda birinde Algan Cavuldak vd. (2019) karadut yaprağındaki fenolik maddelerin ekstraksiyonu üzerine çözücü:kati oranının etkisinin istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) olduğunu belirlemişlerdir. Çözücü oranının artmasının bitki materyalinin ultrasonik ses dalgaları ile parçalanmasını kolaylaştırdığını bildirmişlerdir. Çigeroğlu vd. (2017) ise ekstraksiyonda kullanılan çözücü miktarı arttıkça narenciye yapraklarından daha fazla fenolik ve flavonoid bileşiğin ekstrakte edilebildiğini, 50:1 (v/w) çözücü:kati oranında ise en yüksek miktarda fenolik bileşiğin ekstrakte edilebildiğini bildirmişlerdir. Çözücü miktarının artırılmasının kütle transfer hızını artırdığını ve ekstraksiyon verimini belirli bir noktaya kadar yükselttiğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan optimizasyon çalışması sonunda optimum çözücü oranının 20:1 (v/w) olduğunu saptamışlardır. Ez Zoubi vd. (2021) *Lavandula stoechas* bitkisinden fenolik maddelerin ekstraksiyonunda çözücü:kati oranının 20 mL/g'dan 30 mL/g düzeyine yükseltilmesinin fenolik ekstraksiyon verimini artırdığını bildirmişlerdir.

Toplam karotenoid miktarı

Farklı koşullarda ultrasonik ekstraksiyon uygulanan kuşburnu meyve etinin toplam karotenoid miktarı Şekil 2'de gösterilmiştir. Buna göre ultrasonikasyon süresi arttıkça toplam

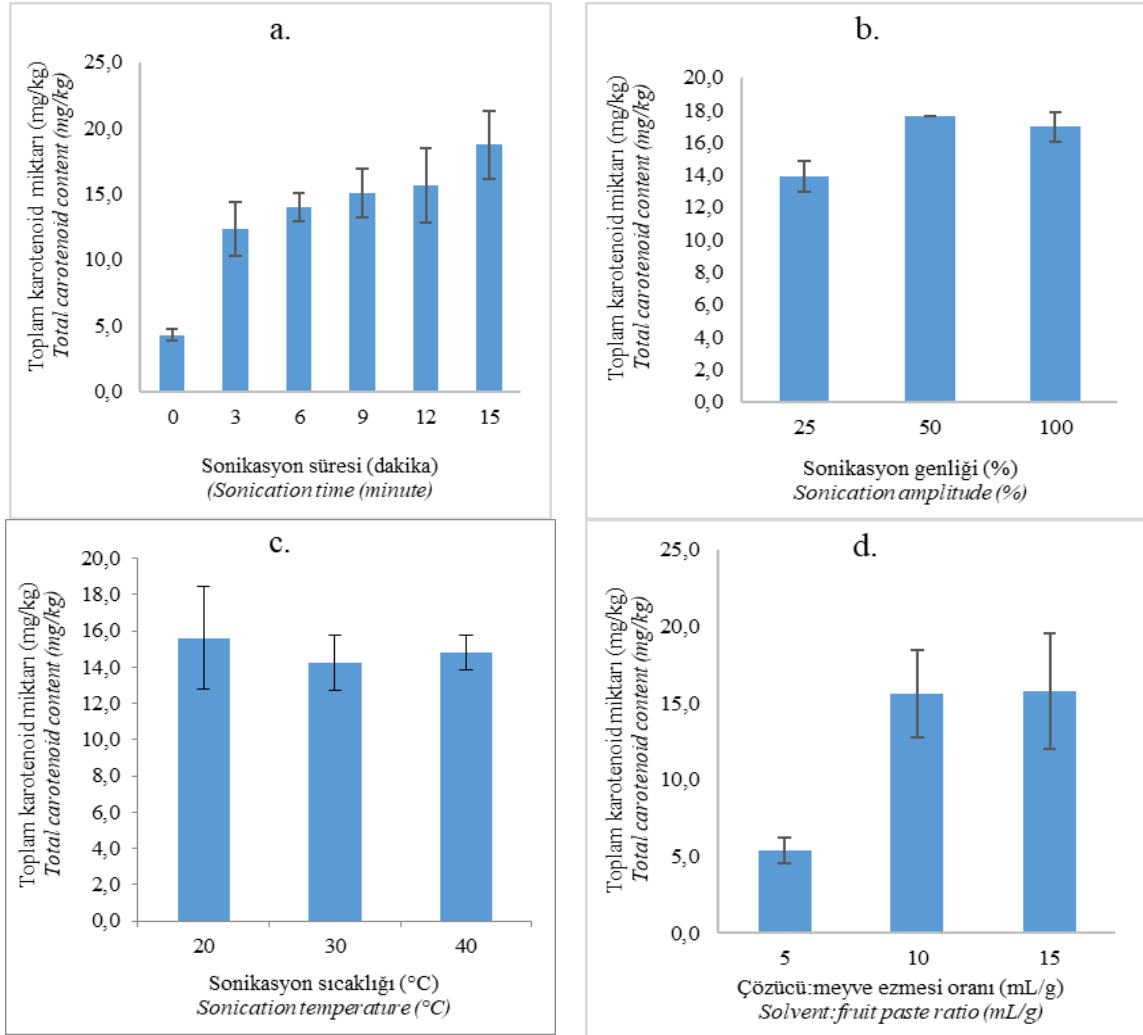
karotenoid miktarının arttığı saptanmıştır ($P <0.05$). Toplam karotenoid miktarı 4.29 mg/kg KM değerinden, düzenli bir artış göstererek 15 dakika sonunda 18.70 mg/kg değerine yükselmiştir (Şekil 2.a).

Jabbar vd. (2014) ultrasonik ses dalgaları uygulanan havuç suyunda karotenoid miktarının artmasının, hücre duvarlarının kaviteasyonun mekanik etkisi ile parçalanmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir. Purohit ve Gogate (2015) havuç atıklarından β -karotenin ultrasonik ekstraksiyonunda ilk 50 dakika ekstraksiyon veriminin arttığını, daha sonra ise azaldığını bildirmişlerdir. 10-30. dakikalar arasında ekstraksiyon veriminin %50.40, 30-50. dakikalar arasında ise %11.52 düzeyinde olduğunu bildirmişlerdir.

Ultrasonikasyon genliğindeki artış ekstrakte edilen toplam karotenoid miktarında anlamlı bir değişime neden olmuştur ($P <0.05$). En yüksek toplam karotenoid miktarı (17.62 mg/kg KM) %50 genlik uygulandığında saptanmıştır (Şekil 2.b). Toplam fenolik madde miktarı da bu genlik değerinde çalışıldığında en yüksek olmuştur.

Kuşburnu nektarlarında sedimantasyon problemini önlemek amacıyla Atalar vd. (2020) yaptıkları çalışmada, ultrasonikasyon genliği ve uygulama süresi arttıkça toplam karotenoid miktarının arttığını ($P <0.05$) ve en yüksek toplam karotenoid miktarının ise (24.11 μ g β -karoten eşdeğeri/mL) %100 genlik ve 30 dakika ultras ses dalgası uygulandığında saptandığını bildirmişlerdir.

En yüksek toplam karotenoid miktarı (15.6 mg/kg KM) 20°C'de işlem uygulandığında saptanmıştır (Şekil 2.c). Sıcaklık 30 ve 40°C'ye yükseltildiğinde toplam karotenoid miktarında bir miktar düşme olmasına rağmen, değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$). Aksine Chuyen vd., (2020) 30-50°C aralığında ekstrakte edilen β -karoten verimi üzerine sıcaklığın etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 2. Farklı koşullarda ultrasonik ekstraksiyon uygulanan kuşburnu meyvesinin toplam karotenoid miktarı (mg β -karoten/kg KM) (a) Ultrasonikasyon süresinin etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 20°C sıcaklık ve 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı) (b) Ultrasonikasyon genliğinin etkisi (10 g meyve ezmesi, 20°C sıcaklık, 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı, 12 dakika ultrasonikasyon süresi) (c) Ultrasonikasyon sıcaklığının etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı, 12 dakika ultrasonikasyon süresi) (d) Çözücü:meyve ezmesi oranının etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 20°C sıcaklık, 12 dakika ultrasonikasyon süresi)

Figure 2. Total carotenoid content of rosehip fruit extracted ultrasonically under different conditions (mg β -carotene/kg DW) (a) Effect of ultrasonication time (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 20°C temperature, 5 mL/g solvent:fruit pulp) (b) Effect of ultrasonication amplitude (10 g fruit pulp, 20°C temperature, 5 mL/g solvent:fruit pulp, 12 minute ultrasonication time) (c) Effect of ultrasonication temperature (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 5 mL/g solvent/fruit pulp, 12 minute ultrasonication time) (d) Effect of solvent:fruit paste ratio (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 20°C temperature, 2 minute ultrasonication time).

Ye vd. (2011) karotenoid bileşiklerin mısırdan ultrasonik ekstraksiyonunda 38-40°C arasındaki sıcaklık uygulamasının 26-30°C arasındaki ekstraksiyon sıcaklığına göre daha etkili olduğunu, ancak 66°C civarındaki sıcaklıklarda bazı karotenoidlerdeki çift bağların kırıldığını bildirmişlerdir. Purohit ve Gogate (2015) ise 20-50°C arasındaki ekstraksiyon sıcaklıkları uygulandığında β -karoten veriminin arttığını gözlemişlerdir. Sıcaklıkla ekstraksiyon veriminin artmasının çözücü içinde β -karotenin çözünürlüğünün artmasından ve ultrases dalgaları ile oluşan boşlukların sayısının artmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Çözücü:meyve ezmesi oranı 15 mL/g olduğunda toplam karotenoid miktarı en yüksek (15.8 mg/kg KM) bulunmuştur. Ancak oran 10 veya 15 mL/g olduğunda toplam karotenoid miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($P > 0.05$, Şekil 2.d). Purohit ve Gogate (2015) katı:çözücü oranı 0.1:20 ile 0.3:20 g/mL arasındayken havuç atıklarından β -karoten ekstraksiyon veriminin arttığını, 0.3:20 ile 0.6:20 g/mL arasında ise verimin düştüğünü saptamışlardır. Katı miktarı arttıkça ekstraksiyon için daha fazla çözücü gerektiğini bildirmişlerdir.

Antioksidan aktivite

Ultrasonikasyon parametrelerinin kuşburnu meyvesinin antioksidan aktivitesi üzerine etkisi Şekil 3'de verilmiştir. Sonikasyon süresinin artırılması ekstrakte edilen biyoaktif bileşiklerde artışa neden olduğundan antioksidan aktivitede özellikle 3. dakikada (303.4 $\mu\text{mol/g}$ KM) anlamlı bir artış gerçekleşmiştir ($P < 0.05$). Ancak 3 dakikadan daha uzun sonikasyon uygulandığında antioksidan aktivitedeki artış düşük olmuş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$, Şekil 3.a).

Toplam fenolik madde miktarı ile toplam karotenoid miktarında da benzer değişimler saptanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi antioksidan özellikteki fenolik maddeler ve karotenoid bileşikler dışında kuşburnunda bulunan askorbik asit gibi diğer antioksidanların da ekstraksiyonunu sağlamış olabilir. Bu araştırmadaki sonuçlara benzer şekilde Li vd. (2016) ultrasonik ekstraksiyon süresi arttıkça sabit sıcaklık ve etanol

konsantrasyonunda perilla (biftekotu) yapraklarından hazırlanan ekstraktın antioksidan aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Antioksidan aktivite ile toplam fenolik madde ve rosmarinik asit miktarları arasında ise yüksek korelasyon olduğu bildirilmiştir. Sonikasyon süresindeki artışın toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite üzerine olumlu etkisi Algan Cavuldak vd. (2019) tarafından da belirtilmiştir. Çalışmalarında karadut yaprak ekstraktının DPPH ile belirlenen antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik madde miktarı arasında yüksek korelasyon ($R^2=0.8381$) olduğunu saptamışlardır.

Chuyen vd. (2020) ise, β -karotene zengin tropikal bir kavun olan *Momordica cochinchinensis* Spreng.'ın kabuklarından ultrasonik ekstraksiyon yoluyla hazırlanan ekstraktın antioksidan aktivitesi üzerine ekstraksiyon süresinin kuadratik etkisinin istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) olduğunu bildirmişlerdir.

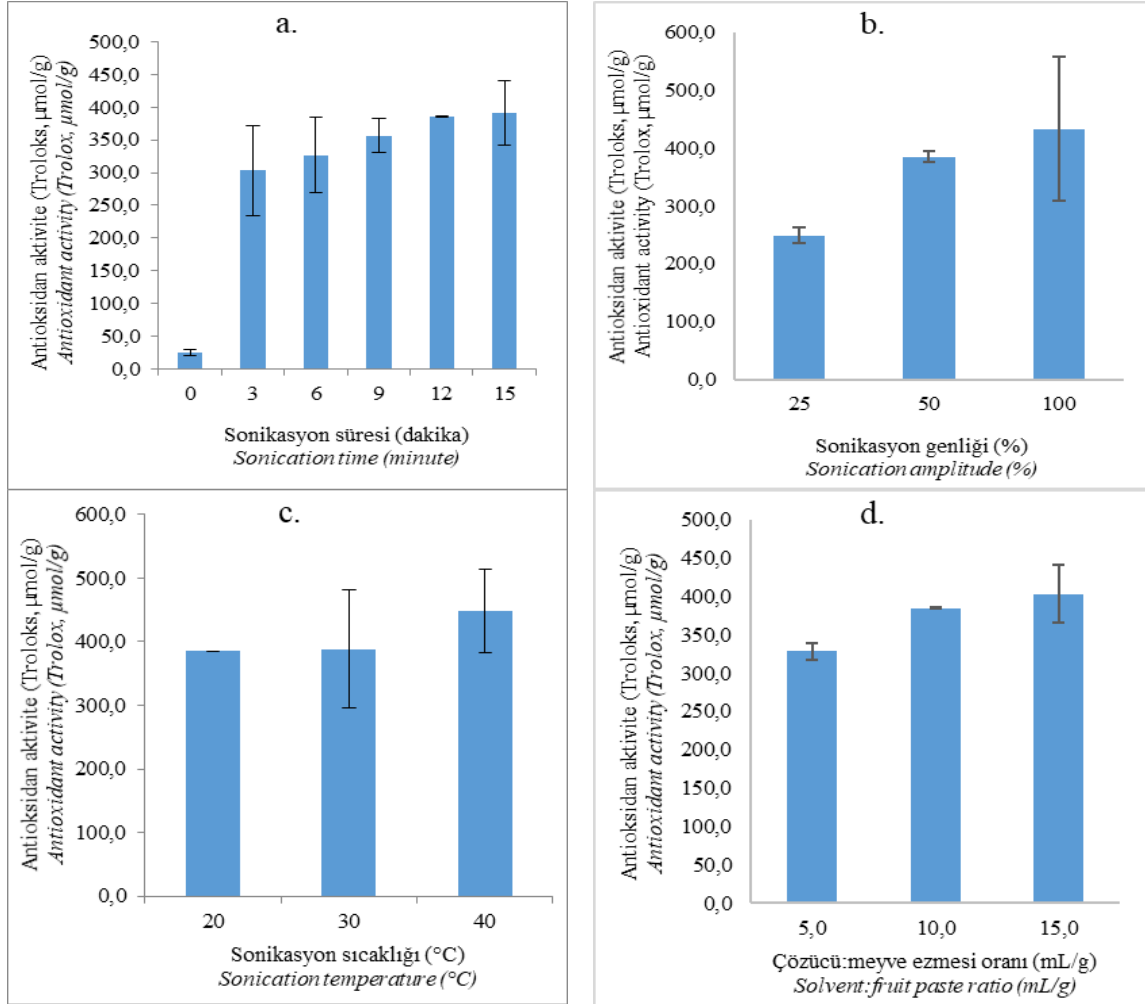
Sonikasyon genliğinin artırılması antioksidan aktivitede artış sağlamış olsa da, bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$). %25, %50 ve %100 sonikasyon genlikleri uygulandığında antioksidan aktivite 248.9, 384.2 ve 432.3 $\mu\text{mol/g}$ KM olarak belirlenmiştir (Şekil 3.b). Genliğin artması ultrasonikasyon gücünün artmasına ve dolayısıyla kavitasyon etkisinin artmasına yolculmaktadır (Poyraz vd., 2021). Bir çalışmada ultrasonikasyon genliğinin %50'den %100'e artırılması ile kuşburnu nektarının antioksidan aktivitesinin (FRAP) arttığı belirtilmektedir (Atalar ve ark., 2020).

En yüksek antioksidan aktivite 447.9 $\mu\text{mol/g}$ KM 40°C'de saptanmıştır (Şekil 3.c). Sonikasyon sıcaklığı arttıkça antioksidan aktivitede bir miktar artış olmuş, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P > 0.05$). Benzer şekilde Algan Cavuldak vd. (2019) karadutun ultrasonik ekstraksiyonunda sıcaklığın antioksidan aktivite üzerine etkisinin anlamlı olmadığını ($P > 0.05$) saptamışlardır. Ancak çeşitli araştırmalarda ultrasonikasyon sıcaklığındaki artışın bileşenlerin ekstraksiyonunda olumlu etkilerinden bahsedilmektedir (İlbağ vd., 2013a; Algan Cavuldak vd., 2019; Poyraz vd., 2021).

Ultrasonik ekstraksiyonun kuşburnunun biyoaktif bileşikleri üzerine etkisi

Çözücü:meyve ezmesi oranı arttıkça (5, 10 ve 15 mL/g) antioksidan aktivitenin arttığı gözlenmiştir ($P<0.05$). En yüksek antioksidan aktivite (403.3

$\mu\text{mol/g KM}$), çözücü:meyve ezmesi oranı 15 mL/g olduğunda saptanmıştır (Şekil 3.d).



Şekil 3. Farklı koşullarda ultrasonik ekstraksiyon uygulanan kuşburnu meyvesinin antioksidan aktivitesi (troloks eşdeğeri, $\mu\text{mol/g KM}$) (a) Ultrasonikasyon süresinin etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 20°C sıcaklık ve 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı) (b) Ultrasonikasyon genliğinin etkisi (10 g meyve ezmesi, 20°C sıcaklık, 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı, 12 dakika ultrasonikasyon süresi) (c) Ultrasonikasyon sıcaklığının etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 5 mL/g çözücü:meyve ezmesi oranı, 12 dakika ultrasonikasyon süresi) (d) Çözücü:meyve ezmesi oranının etkisi (10 g meyve ezmesi, %50 ultrasonikasyon genliği, 20°C sıcaklık, 12 dakika ultrasonikasyon süresi)

Figure 3. Antioxidant activity of rosehip fruit extracted ultrasonically under different conditions (trolox equivalent, $\mu\text{mol/g DW}$) (a) Effect of ultrasonication time (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 20°C temperature, 5 mL/g solvent:fruit pulp) (b) Effect of ultrasonication amplitude (10 g fruit pulp, 20°C temperature, 5 mL/g solvent:fruit pulp, 12 minute ultrasonication time) (c) Effect of ultrasonication temperature (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 5 mL/g solvent/fruit pulp, 12 minute ultrasonication time) (d) Effect of solvent:fruit paste ratio (10 g fruit pulp, 50% ultrasonication amplitude, 20°C temperature, 2 minute ultrasonication time).

SONUÇ

Bu çalışmada farklı ultrasonikasyon parametrelerinin (süre, genlik, sıcaklık ve çözücü:meyve ezmesi oranı) kuşburnundan ekstrakte edilen biyoaktif bileşen (fenolik ve karotenoid bileşikler) miktarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Sonikasyon parametrelerinin bazıları, biyoaktif bileşenlerden toplam karotenoid ve toplam fenolik madde miktarları ile antioksidan aktivitede artışa neden olmuştur. Çalışma sonuçlarına göre, ultrasonik ekstraksiyon yönteminin kuşburnu meyvesinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılabilirliği düşünülmektedir. Ancak ekstraksiyonda optimum sonikasyon koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Optimum koşullar belirlenirken en yüksek biyoaktif bileşiğin ekstrakte edildiği, minimum enerji ve sürenin uygulandığı koşulların esas alınması uygun olacaktır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Makalenin yazarları arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZAR KATKILARI

S. Turan, deney tasarımını oluşturmuş, denemelerin ve analizlerin gerçekleştirilmesini sağlamış, sonuçları değerlendirmiş, istatistiksel analizleri gerçekleştirmiş ve makaleyi düzenlemiştir. D. Atalay, denemeleri yapmış, analiz sonuçlarını değerlendirmiş ve makalenin yazımına katkı sunmuştur. R. Solak, M. Demirtaş ve M. Özoğul denemelerin ve analizlerin yapılmasında görev almıştır. Makalenin son hali yazarlar tarafından okunmuş ve onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Yazarlar Ultrasonik homojenizatör cihazının kullanımını sağlayan Prof. Dr. Hande Selen Erge'ye teşekkürlerini sunarlar.

KAYNAKLAR

AOAC (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 15th Edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Atalar, I., Saricaoglu, F.T., Odabas, H.I., Yilmaz, V.A., Gul, O. (2020). Effect of ultrasonication

treatment on structural, physicochemical and bioactive properties of pasteurized rosehip (*Rosa canina* L.) nectar. *LWT - Food Sci Technol*, 118: 108850, 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108850>.

Algan Cavuldak, Ö.A., Vural, N., Akay, M.A., Anlı, R.E. (2019). Optimization of ultrasound-assisted water extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from black mulberry leaves (*Morus nigra* L.). *J Food Process Eng*, 42:e13132, 1-15, <https://doi.org/10.1111/jfpe.13132>.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem*, 34: 540–560, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>.

Chuyen, H.V., Roach, P.D., Golding, J.B., Parks, S.E., Nguyen, M.H. (2020). Ultrasound-assisted extraction of GAC peel: An optimization of extraction conditions for recovering carotenoids and antioxidant capacity. *Processes*, 8(8): 1-12, <https://doi.org/10.3390/pr8010008>.

Çigeroğlu, Z., Kırbaslar, Ş. İ., Şahin, S., Köprücü, G. (2017). Optimization and kinetic studies of ultrasound-assisted extraction on polyphenols from Satsuma Mandarin (*Citrus Unshiu Marc.*) leaves. *Iran J Chem Chem Eng*, 36(5): 163-171, <https://doi.org/10.30492/IJCCE.2017.30032>.

Demir, N., Yıldız, O., Alpaslan, M., Hayaloğlu, A.A. (2014). Evaluation of volatiles, phenolic compounds and antioxidant activities of rose hip (*Rosa* L.) fruits in Turkey. *LWT - Food Sci Technol*, 57: 126-133, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.038>.

Duru, N., Karadeniz, F., Erge, H.S. (2011). Changes in bioactive compounds, antioxidant activity and HMF formation in rosehip nectars during storage. *Food Bioprocess Technol*, 5: 2899-2907, <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0657-9>.

Esclapez, M.D., Garcia-Perez, J.V., Mulet, A., Carcel, J.A. (2011). Ultrasound-assisted extraction

- of natural products. *Food Eng Rev*, 3:108–120, <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9036-6>.
- Ez Zoubi, Y., Fadil, M., Bousta, D., Lalami, A.E.O., Lachkar, M., Farah, A. (2021). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Moroccan *Lavandula stoechas* L.: Optimization using response surface methodology. *J Chem*, 2021: 8830902, 1-11, <https://doi.org/10.1155/2021/8830902>.
- Fan, C., Pacier, C., Martirosyan, D.M. (2014). Rose hip (*Rosa canina* L): A functional food perspective. *Funct Foods Health Dis*, 4(11): 493-509, <https://doi.org/10.31989/ffhd.v4i12.159>.
- İlbay, Z., Şahin, S., Kırbaşlar, Ş.İ. (2013a). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. *J Sci Food Agric*, 93: 2804–2809, <https://doi.org/10.1002/jsfa.6104>.
- İlbay, Z., Şahin, S., Kırbaşlar, Ş.İ. (2013b). Investigation of polyphenolic content of rosehip (*Rosa canina* L.) tea extracts: A comparative study, *Foods*, 2: 43-52, <https://doi.org/10.3390/foods2010043>.
- Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Hashim, M.M., Saeeduddin, M., Lei, S., Wu, T., Zeng, X. (2014). Influence of sonication and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. *Int J Food Sci Technol*, 49: 2449–2457, <https://doi.org/10.1111/ijfs.12567>.
- Lattanzio, F., Greco, E., Carretta, D., Cervellati, R., Govoni, P., Speroni, E. (2011). In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract. *J Ethnopharmacol*, 137: 880–885, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.006>.
- Li, H.-Z., Zhang, Z.-J., Xue, J., Cui, L.-X., Hou, T.-yu, Li, X.-J., Chen, T. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants and rosmarinic acid from perilla leaves using response surface methodology. *Food Sci Technol*, 36(4): 686-693, <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.13516>.
- Mannozi, C., Foligni, R., Scalise A., Mozzon M. (2020). Characterization of lipid substances of rose hip seeds as a potential. Source of functional components: A review. *Ital J Food Sci*, 32: 721-733, <https://doi.org/10.14674/IJFS.1867>.
- Martínez-Flores, H.E., Garnica-Romo, M.G., Bermúdez-Aguirre, D., Pokhrel P.R., Barbosa-Cánovas, G.V. (2015). Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermop-sonicated carrot juice during storage. *Food Chem*, 172: 650-656, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.072>.
- Milić S.M. Kostic M.D. Milić P.S. Vucic V.M. Arsic A.C. Veljkovic V.B. Stamenkovic O.S. (2020). Extraction of oil from rosehip seed: Kinetics, thermodynamics, and optimization. *Chem Eng Technol*, 43(12): 2373–2381, <https://doi.org/10.1002/ceat.201900689>.
- Patel S. (2017). Rose hip as an underutilized functional food: Evidence-based review. *Trends Food Sci Technol*, 63: 29-38, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.001>.
- Poyraz, Ç., Küçükyıldız, G., Kırbaşlar, Ş.İ., Çigeroğlu, Z., Şahin, S. (2021). Valorization of Citrus unshiu biowastes to value-added products: An optimization of ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology and particle swarm optimization. *Biomass Convers Bior*, Published online 1 Feb 2021, <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01329-9>.
- Purohit, A.J., Gogate, P.R. (2015). Ultrasound-assisted extraction of β -carotene from waste carrot residue: Effect of operating parameters and type of ultrasonic irradiation. *Sep Sci Technol*, 50: 1507–1517, <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.978472>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26:1231–1237, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).
- Shahidi, F., Chavan, U., Naczk, M., Amarowicz, R. (2001). Nutrient distribution and phenolic antioxidants in air-classified fractions of beach pea (*Lathyrus maritimus* L.). *J Agric Food Chem*, 49:926–933, <https://doi.org/10.1021/jf0005317>.

Şahin, S., Pekel, A.G., Toprakçı, I. (2020). Sonication-assisted extraction of *Hibiscus sabdariffa* for the polyphenols recovery: application of a specially designed deep eutectic solvent. *Biomass Convers Biorefin*, published online 1 July 2020, <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00837-4>.

Wenzig, E.M. Widowitz, U. Kunert, O. Chrubasik, S. Bucara, F. Knauder, F. Bauer R. (2008) Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations. *Phytomedicine*, 15: 826–835, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.06.012>.

Wong, S.T., Tan, M.C., Geow, C.H. (2019). Optimization of ultrasound-assisted ethanol extraction of hazelnut oil. *J Food Process Preserv*, 43(10): e14138. 1-9, <https://doi.org/10.1111/jfpp.14138>.

Ye, J., Feng, L., Xiong, J., Xiong, Y. (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *Int J Food Sci Technol*, 46: 2131–2136, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02727.x>.

ASSESSMENT OF PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY QUALITY OF BEEF PATTIES FORMULATED WITH PENNYROYAL (*Mentha pulegium* L.) POWDER

Farida Guliyeva, Sadettin Turhan*

Department of Food Engineering, Engineering Faculty, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey

Received /Geliş: 06.01.2021; Accepted / Kabul: 21.04.2021; Published online / Online baskı: 10.05.2021

Guliyeva, F., Turhan, S. (2021). Assessment of physicochemical and sensory quality of beef patties formulated with pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) powder. GIDA (2021) 46 (3) 739-750 doi: 10.15237/gida.GD21011

Guliyeva, F., Turhan, S. (2021). Yarpuz (*Mentha pulegium* L.) tozu ile formüle edilen sığır köftelerinin fizikokimyasal ve duyu kalitesinin değerlendirilmesi. GIDA (2021) 46 (3) 739-750 doi: 10.15237/gida.GD210118

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the physicochemical and sensory quality of beef patties containing different levels of pennyroyal powder (PP) during storage at 4 °C for up to 9 days. The PP was added to patties at 0.75, 1.5, 2.25, and 3.0% levels and compared to negative (without PP) and positive controls (0.01% propyl gallate). The PP addition decreased the protein content and increased the ash content ($P < 0.05$). The PP inclusion improved cooking loss, but negatively affect the hardness and overall acceptability ($P < 0.05$). However, overall acceptability scores of patties containing up to 1.5% PP were similar to the negative and positive controls ($P > 0.05$). The PP incorporation improved the pH, lipid, and color stability during the storage period ($P < 0.05$). Thus, the inclusion of 1.5% PP could be recommended to retard the lipid and color oxidation of patties with minimal compositional, textural, and sensory changes.

Keywords: Beef patty, pennyroyal, quality, storage stability

YARPUZ (*Mentha pulegium* L.) TOZU İLE FORMÜLE EDİLEN SİĞİR KÖFTELERİNİN FİZİKOKİMYASAL VE DUYUSAL KALİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZ

Bu çalışma, farklı düzeylerde yarpuz tozu (YT) içeren sığır köftelerinin 4 °C'de 9 güne kadar depolama sırasında fizikokimyasal ve duyu kalitesini değerlendirmek için gerçekleştirilmiştir. YT, köfte formülasyonlarına %0.75, 1.5, 2.25 ve 3.0 düzeylerinde ilave edilmiş ve gruplar, negatif (YT içermeyen) ve pozitif kontrol (%0.01 propil gallat içeren) ile karşılaştırılmıştır. YT ilavesi protein miktarını düşürmüştür, kül miktarını artırmıştır ($P < 0.05$). YT ilavesi pişirme kaybını azaltmış ancak sertliği ve genel kabul edilebilirliği olumsuz yönde etkilemiştir ($P < 0.05$). Bununla birlikte %1.5'e kadar YT içeren köftelerin genel kabul edilebilirlik puanları, negatif ve pozitif kontrole benzer bulunmuştur ($P > 0.05$). YT ilavesi depolama süresince pH, lipid ve renk stabilitesini geliştirmiştir ($P < 0.05$). Böylece minimum bileşimsel, tekstürel ve duyu değişikliklerle köftelerin lipid ve renk oksidasyonunu yavaşlatmak için %1.5 düzeyinde YT kullanımı önerilebilir.

Anahtar kelimeler: Sığır köftesi, yarpuz, kalite, depolama stabilitesi

*Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ sturhan@omu.edu.tr

☎ (+90) 362 312 1919/1503

☎ (+90) 362 457 6034

Farida Guliyeva; ORCID no: 0000-0002-5281-0270

Sadettin Turhan; ORCID no: 0000-0002-3510-4382

INTRODUCTION

Minced meat products called beef patty, burger, or meatball are very popular foods among consumers of all age groups in many countries due to their easy preparation, attractive sensory properties, and low price (Selani et al., 2016; Hautrive et al., 2019; Öztürk and Turhan, 2020). However, the fact that these meat products often lack dietary fiber which should be present in a healthy diet (Öztürk and Turhan, 2020), and are exposed to apart from microbial spoilage, lipid oxidation during cold storage require them to be supplemented with different additives (Fernandez-Lopez et al., 2005; Juntachote et al., 2007). Because oxidative reactions in meat during processing and storage result in deterioration of color and sensory quality and decreased shelf-life (Fernandez-Lopez et al., 2005; Juntachote et al., 2006; Choe et al., 2011). Also, it can lead to the potential formation of toxic oxidation compounds (Juntachote et al., 2006). Although synthetic additives have been widely used in the meat industry to overcome these problems, the trend is to decrease their use because of the toxicity and carcinogenicity of such chemical additives (Fernandez-Lopez et al., 2005; Juntachote et al., 2006, 2007; Choe et al., 2011). Therefore, the addition of plant materials can provide dietary fiber, vitamins, and phenolic compounds and enhance oxidative stability.

Pennyroyal (*Mentha pulegium*) is an aromatic herb that belongs to the family Lamiaceae, is naturalized in America, and thrives in Western, Southern and Central Europe, Asia, Iran, Arab countries, and Ethiopia (Teixeira et al., 2012). It is a perennial, and herbaceous plant, which can reach up to half a meter in height (Gülçin et al., 2020). Its essential oil and dry parts have been traditionally used in medicine (digestive, liver and gallbladder disorders, amenorrhea, gout, colds, increased micturition, skin diseases, and abortifacient), gastronomy (culinary herb), aromatherapy, and cosmetics (Teixeira et al., 2012; Çelik et al., 2017). Recent research has shown that extracts of pennyroyal are an excellent source of phenolic compounds such as kaempferol-3-O-rutinoside, quercetagenin-3,6-dimethylether, fumaric acid, chlorogenic acid,

apigenin, and epicatechin, which are responsible for antioxidant capacity (Çelik et al., 2017; Gülçin et al., 2020). Despite the high phenolic content and antioxidant capacity of pennyroyal, there are limited studies on the use of its essential oil, powder, and extracts in foods. For example, Kamkar et al. (2010) reported that water extract of pennyroyal is a potent antioxidant for sunflower oil during storage.

Unfortunately, there are no studies about the application of pennyroyal essential oil, powder, or extracts in meat systems. Therefore, this study aimed to assess the effect of the use of pennyroyal powder on physicochemical (proximate composition, cooking loss, texture, pH, TBARS, and color) and sensory quality of beef patties during cold storage (4 °C).

MATERIAL AND METHOD

Materials

Pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants were collected from their natural habitat, Baku, Azerbaijan, in early July 2019. The plants were dried in a dark place at room temperature, powdered using an electrical device, and passed through a 0.5 µm sieve. The obtained pennyroyal powder (moisture 11.80%) was kept in the refrigerator until use. The minced beef (moisture 61.90%, protein 21.56%, fat 14.54%, and ash 1.00%) and beef fat (moisture 8.05%, fat 87.65%) were supplied from a butcher shop in Samsun city, Turkey. Food grade propyl gallate (PG) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Unless otherwise stated, all chemicals used were of analytical grade.

Total phenolic content and antioxidant activity of the pennyroyal powder

Extraction procedure

For the extraction of phenolic compounds in pennyroyal, 5 g of pennyroyal powder was mixed with 20 mL of 80% methanol aqueous solution, placed in an ultrasonic bath (Bandelin Sonorex, RK 100, Germany), and sonicated at room temperature for 15 min. At the end of sonication, the suspension was left in dark at room temperature for 12 h and filtrated through filter paper (Whatman No. 1, Maidstone, UK). The

obtained extract was used for both the total phenolic content and antioxidant activity determinations.

Determination of total phenolic content

Total phenolic content was determined following the method described by Singleton and Rossi (1965) with some modifications. Briefly, 20 μL of the diluted pennyroyal extract was transferred to test tubes and mixed with diluted (1:10 with water) Folin-Ciocalteu reagent (100 μL), distilled water (1580 μL), and 7.5% Na_2CO_3 solution (300 μL). After incubating the test tubes in dark at room temperature for 2 h, the absorbance (760 nm) of the solutions was measured. The total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE)/g sample.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity

The DPPH scavenging activity assay was carried out following the protocol described by Nakajima et al. (2004), with a slight modification. Briefly, 50 μL of the diluted pennyroyal extract was added to 1 mL of DPPH methanol solution (100 μM). After incubating in dark for 2 h, the absorbance readings were performed at 517 nm. The results were expressed using Trolox as standard: mmol Trolox equivalents (TE)/g sample.

Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

The FRAP assay was performed according to the methodology, described by Gao et al. (2000). Briefly, 50 μL of the diluted pennyroyal extract was mixed with 0.95 mL ferric-2,4,6-tripyridil-s-triazine (TPTZ) reagent (which was done by mixing 300 mM acetate buffer, pH 3.6, 10 mM TPTZ in 40 mM HCl and 20 mM FeCl_3 at the ratio 10:1:1, respectively). After incubating at room temperature for 5 min, the absorbance readings were performed at 593 nm. The results were expressed using Trolox as standard: mmol TE/g sample.

Preparation of beef patties

Two separate trials were performed on different days using different minced meat and beef fat but the same ingredients, and 6 kg of beef patties were manufactured for each trial. Six different batches

of beef patties were produced as follows: 1) CON - negative control (78.50% minced beef + 20% beef fat + 1.5% salt); 2) PG - positive control (78.49% minced beef + 20% beef fat + 1.5% salt + 0.01% PG); 3) P075 (77.75% minced beef + 20% beef fat + 1.5% salt + 0.75% pennyroyal powder); 4) P150 (77.00% minced beef + 20% beef fat + 1.5% salt + 1.5% pennyroyal powder); 5) P225 (76.25% minced beef + 20% beef fat + 1.5% salt + 2.25% pennyroyal powder); 6) P300 (75.50% minced beef + 20% beef fat + 1.5% salt + 3.0% pennyroyal powder). All batches were mixed for 10 min to obtain a homogenous mass, weighed into ~ 25 g portions, and shaped by hand with gloves. The final products with a mean of 50 mm diameter and 10 mm thickness were aerobically packaged in polyamide bags with an oxygen transmission rate of $52.4 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24 \text{ h}$ at 1 atm and $23 \text{ }^\circ\text{C}$ and stored at $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ home-type refrigerator for 9 days. Proximate composition, cooking loss, texture parameters, and sensory attributes of samples were evaluated at the initial day of storage, while the pH, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and color parameters were analyzed on days 0, 3, 6, and 9 of storage.

Determination of proximate composition, cooking loss and texture parameters

The proximate composition (moisture, protein, fat, and ash) of the beef patties and raw materials was determined according to the official standard method (AOAC, 2000). For cooking loss, beef patties were cooked in a preheated electrical grill (Arçelik Midi Fırın, Turkey) for a total of 8 min, 5 min one side and 3 min the other side. The weight of three meatballs per batch was measured at room temperature, before and after cooking to calculate the percentage of cooking loss, and the results were expressed in percentage (%).

Texture parameters of the beef patties were determined at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ using a Texture Analyzer (TA-XT Plus, Stable Micro Systems, UK) equipped with an aluminum cylindrical probe (model P/50R). For analysis, samples were placed on the center of the TPA platform and compressed twice to 60% of their original height. The conditions were as follows: pre-test speed 2.0

mm/s, post-test speed 5.0 mm/s, test speed 5.0 mm/s, and the testing interval 5 s. The values for hardness (N), springiness (mm), cohesiveness, and chewiness (N.mm) were calculated from the curves provided by the equipment (Öztürk and Turhan, 2020).

Evaluation of sensory attributes

Sensory properties (appearance, flavor, juiciness, and tenderness) of the beef patties were evaluated by an experienced panelist group of 10 members from the staff and graduate students on the initial day of storage. All sensory work was carried out in the sensory evaluation room under fluorescence lighting to minimize the scope of errors. The cooked samples were cooled to room temperature, cut into blocks, coded with a three-digit random number, and served to each panelist. The panelists evaluated the samples randomly and after rating each sample, rinsed their mouths with water and waited 1-2 min before evaluating the next sample. A 9- point hedonic scale was used to assess appearance and flavor (1 = undesirable to 9 = desirable), while a 9- point descriptive scale was used to assess juiciness (1 = dry to 9 = juicy) and tenderness (1 = tough to 9 = tender). The overall acceptability was calculated taking into account appearance, flavor, juiciness, and tenderness (each with 25%) (Turhan et al., 2014).

Determination of pH value and TBARS content

The pH values of the stored beef patties were determined in homogenates composed of 10 g of sample and 100 mL of distilled water. Readings were taken with a digital pH-meter (Cyberscan PC 510, Singapore) at room temperature, and pH-meter calibration was regularly checked.

The TBARS content of the stored beef patties was determined according to the method described by Witte et al. (1970), with a slight modification. Briefly, to 10 g of the beef patty sample, 25 mL of 20% trichloroacetic acid was added, and the mixture was homogenized with a homogenizer (Ultraturrax-IKA, T25 model, Germany) for 2 min. The homogenates were filtered through Whatman No.1 filter paper. Then, 5 mL of 0.02 M 2-thiobarbituric acid (TBA)

solution was added to 5 mL of filtrate, heated in boiling water for 30 min, and cooled down with tap water. The absorbance was measured at 532 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies, Cary 60 model, Australia) against a blank containing 5 mL of 20% trichloroacetic acid and 5 mL of 0.02 M TBA solution. Further, a standard curve was plotted using the compound 1,1,3,3-tetraethoxypropane, and the results obtained were expressed as mg malonaldehyde (MA)/kg sample.

Determination of instrumental color

Instrumental color was measured on the surface of the stored beef patties using a colorimeter (Minolta Chromometer CR-400, Japan). Five patties per batch were randomly selected and three readings were taken from each patty. Color measurement included Hunter L , a , and b parameters, where L represents lightness with a scale from 0 (black) to 100 (white), a represents redness with a scale from -60 (green) to +60 (red), and b represents yellowness with a scale from -60 (blue) to +60 (yellow).

Statistical analysis

The data were analyzed with the SPSS 21 statistical software (IBM, Chicago, IL, USA), and first checked for normal distribution and homogeneity of variances. The obtained data from proximate composition, cooking loss, texture and sensory evaluation were analyzed by one-way ANOVA, while data from pH, TBARS, and color parameters were analyzed by two-way ANOVA. When the ANOVA was significant ($P < 0.05$), differences between means were compared using Duncan's multiple range test. All results were expressed as mean values \pm standard deviations.

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic content and antioxidant activity of pennyroyal powder

Phenolic compounds, which are abundantly found in plants and change depending on genetic and environmental factors, as well as on post-harvest processing conditions, constitute one of the major groups of compounds acting as primary antioxidants or free radical terminators (Shahidi

and Ambigaipalan, 2015). Therefore, it is important to determine the phenolic content of plants used in food applications as antioxidants. In this study, total phenolic content in the

pennyroyal powder was 44.60 mg GAE/g, and the antioxidant capacity measured by DPPH scavenging activity and FRAP was 744.91 and 73.89 mmol TE/g, respectively (Table 1).

Table 1. Total phenolic content and antioxidant capacity of pennyroyal powder¹

Parameters	Values
Total phenolic content (mg GAE/g)	44.60±0.39
DPPH scavenging activity (mmol TE/g)	744.91±36.44
Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (mmol TE/g)	73.89±1.84

¹Values are presented as the mean ± standard deviation of duplicate samples.

A similar phenolic content was recorded by Gülçin et al. (2020) in methanol extract of pennyroyal, while higher phenolic content was recorded by Gülçin et al. (2020) in water extract and Çelik et al. (2017) in methanol extract. Also, similar to our findings, various authors reported that pennyroyal extracts have a strong antioxidant capacity (Teixeira et al., 2012; Çelik et al., 2017; Gülçin et al., 2020). The phenolic content and antioxidant activity of pennyroyal extracts are extremely variable due to different factors including the extraction temperature, time, pH, solvent polarity, as well as the above-mentioned (Gülçin et al., 2020). These findings show that

pennyroyal powder could be a good source of natural antioxidants and use as a natural additive.

Proximate composition and cooking loss of beef patties with pennyroyal powder

The proximate composition and cooking loss of the beef patties formulated with different levels of pennyroyal powder (P075, P150, P225, and P300) and control samples (CON and PG) are given in Table 2. As seen, the addition of pennyroyal powder significantly affected the protein and ash content of beef patties ($P < 0.05$) whereas its effect on moisture, and fat content was not significant ($P > 0.05$).

Table 2. Proximate composition, cooking loss, and texture parameters of beef patties formulated with different levels of pennyroyal powder¹

Parameters	Batches					
	CON ²	PG ³	P075 ⁴	P150 ⁵	P225 ⁶	P300 ⁷
Moisture (%)	50.96±1.29 ^a	52.16±0.80 ^a	49.81±0.71 ^a	50.11±0.97 ^a	48.33±0.42 ^a	48.81±1.26 ^a
Protein (%)	18.86±0.28 ^a	18.76±0.45 ^a	17.84±0.35 ^{ab}	17.37±0.25 ^{bc}	15.96±0.01 ^d	16.46±0.72 ^{cd}
Fat (%)	26.54±0.76 ^a	27.51±0.11 ^a	27.41±0.00 ^a	27.09±0.84 ^a	27.50±0.70 ^a	27.50±0.70 ^a
Ash (%)	2.45±0.04 ^d	2.49±0.08 ^d	2.54±0.00 ^{cd}	2.65±0.06 ^{bc}	2.74±0.00 ^b	2.94±0.05 ^a
Cooking loss (%)	28.57±0.42 ^a	28.00±0.42 ^{ab}	27.28±0.40 ^b	27.39±0.28 ^b	25.08±0.14 ^c	22.33±0.28 ^d
Hardness (N)	86.84±1.28 ^d	94.13±2.34 ^c	101.31±2.82 ^b	95.51±4.55 ^{bc}	117.45±2.82 ^a	116.36±1.10 ^a
Springiness (mm)	0.55±0.02 ^b	0.65±0.04 ^{ab}	0.67±0.04 ^a	0.69±0.04 ^a	0.65±0.01 ^{ab}	0.74±0.05 ^a
Cohesiveness	0.23±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a	0.24±0.01 ^a
Chewiness (N.mm)	10.80±0.56 ^d	14.58±1.56 ^c	17.18±0.70 ^{bc}	16.33±2.02 ^{bc}	18.26±1.41 ^b	22.36±1.52 ^a

¹Values are presented as the mean ± standard deviation of duplicate samples. Means not sharing a common superscript a, b, c or d in a row are significantly different at $P < 0.05$ as assessed by Duncan's multiple range test.

²CON - negative control sample.

³PG - positive control sample with 0.01% propyl gallate.

⁴P075 - sample with 0.75% pennyroyal powder.

⁵P150 - sample with 1.5% pennyroyal powder.

⁶P225 - sample with 2.25% pennyroyal powder.

⁷P300 - sample with 3.0% pennyroyal powder.

The protein content of patties gradually decreased with an increase in pennyroyal powder level, but the ash content increased. The decrease in protein content could result from the dilution effect because the protein content in the pennyroyal powder was lower than in the minced beef. Similarly, Bilek and Turhan (2009) reported a decrease in the protein content of beef patties formulated with different levels of flaxseed flour. Also, Aykin Dinçer et al. (2018) observed a concomitant decrease in protein content in meatballs formulated with retrograded flour. The increase in ash content could be attributable to the high ash content (10.63%) of pennyroyal powder. It was also stated in previous studies that the addition of plant materials containing high amounts of ash to beef patties could increase the ash content of products (Bilek and Turhan, 2009; Alakali et al., 2010; Ran et al., 2020). Despite these changes in protein and ash content, the moisture, protein and fat contents of all beef patties were within the limits of the Turkish Uncooked Meatball Standard (TSE 10581, 2007).

The addition of pennyroyal powder significantly affected the cooking loss of beef patties ($P < 0.05$) and the cooking loss gradually decreased with more pennyroyal powder addition (Table 2). Turhan et al. (2005) reported that cooking losses were due to loss of fat and evaporation of moisture during the cooking process. The improvement in cooking performance with pennyroyal powder addition could be attributed to its high ability to keep moisture and fat in patty matrix. Various researchers also reported that addition of non-meat ingredients to patty formulation reduce the cooking losses. For example, Turhan et al. (2005) reported decreased cooking loss in beef burgers formulated with different levels of hazelnut pellicle. Similarly, Alakali et al. (2010) also observed that addition of bambara groundnut (*Vigna subterranean* L.) seed flour to beef patties resulted in better cooking yield.

Texture parameters of beef patties with pennyroyal powder

As seen in Table 2, the addition of pennyroyal powder to formulation significantly affected the

hardness, springiness, and chewiness ($P < 0.05$) whereas its effect on cohesiveness was not significant ($P > 0.05$). A progressive increase in the pennyroyal powder level remarkably increased the hardness and chewiness values of beef patties but slightly increased the springiness values. However, no significant differences were observed among springiness values of beef patties with pennyroyal powder at different levels. The increase in hardness, springiness, and chewiness with pennyroyal powder addition might be due to the decreasing moisture content (Table 2) with increased levels of pennyroyal powder. Namely, a higher amount of pennyroyal powder may contribute to higher dry matter content which therefore resulted in beef patties with greater hardness and chewiness. It was also reported in previous studies that the addition of plant materials containing high amounts of dry matter to beef patties increases the hardness and chewiness of products (Huang et al., 2005; Aykin Dinçer et al., 2018; Ran et al., 2020). In addition, high-fiber ingredients added to patties can also increase the hardness (Saraiva et al., 2019).

Sensory attributes of beef patties with pennyroyal powder

The incorporation of pennyroyal powder at different levels to beef patties significantly affected the appearance, flavor, and overall acceptability ($P < 0.05$) whereas its effect on juiciness and tenderness was not significant ($P > 0.05$), as shown in Fig. 1.

Generally, the highest appearance, flavor, and overall acceptability scores were observed in the CON and PG samples, and the scores decreased with more pennyroyal powder addition. However, the addition of pennyroyal powder to beef patties at a level up to 1.5% did not affect the flavor and overall acceptability compared to CON and PG, while even the addition of pennyroyal powder level to 0.75% resulted a slightly greenish color and this state was probably evaluated with the lower score by the panelists. Finally, the lowest flavor, appearance, and overall acceptability scores were noticed in P225 and P300 patties due to an intense mint flavor and greenish color formation after high-level pennyroyal powder

addition. Such negative effects of the use of non-meat ingredients at high levels on the sensory properties of comminuted meat products were also reported by many authors. For example, Turhan et al. (2005) reported that overall acceptability scores of beef burgers formulated with different levels of hazelnut pellicle were decreased as the pellicle content increased due to

less mastication and mask the meat flavor. Similarly, Bilek and Turhan (2009) found that the sensory scores of beef patties decreased as the flaxseed content increased and this decrease was higher with more than 6% flaxseed flour addition. Therefore, 1.5% of pennyroyal powder is considered optimum for use as an enhancer to the nutritive value in beef patties.

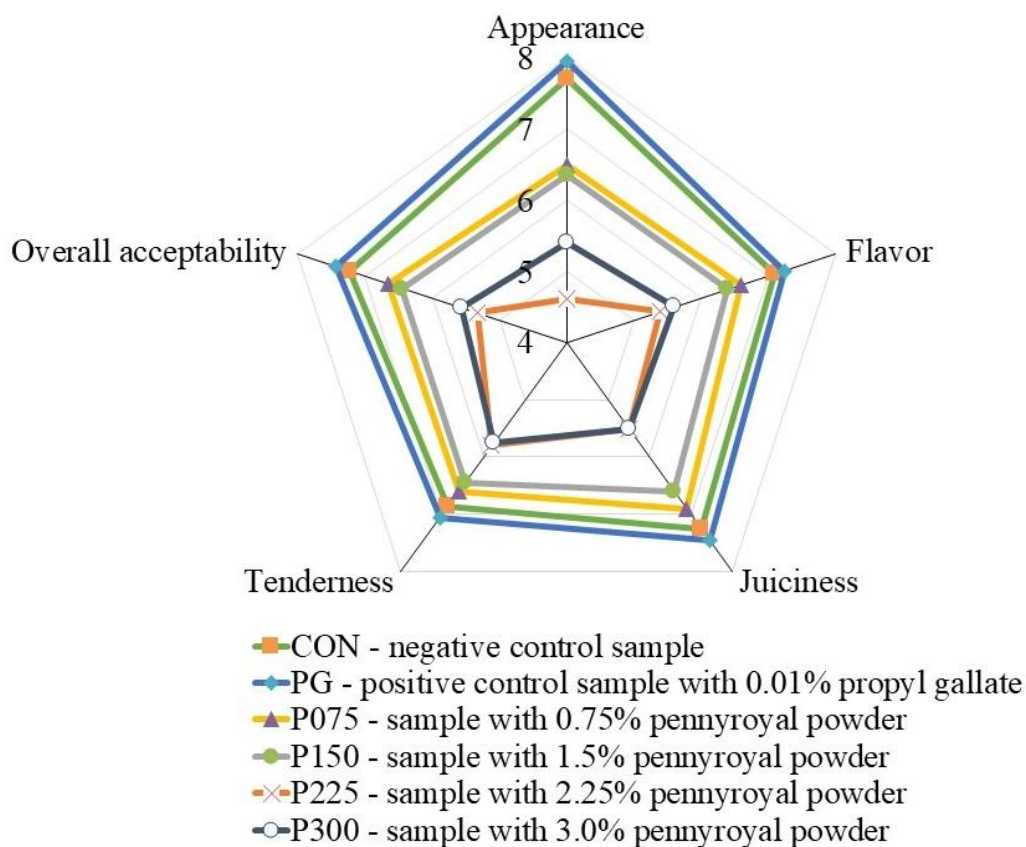


Figure 1. Sensory scores of beef patties formulated with different levels of pennyroyal powder

pH and TBARS values of beef patties with pennyroyal powder during storage

The pH and TBARS values of the beef patties formulated with different levels of pennyroyal powder during storage at 4 °C are given in Table 3. As seen, the initial pH values of beef patty samples ranged from 5.84 to 5.93, and on days 0 and 3 of storage, the differences between pH values of samples were not significantly different ($P > 0.05$). However, the pH values of all samples gradually increased after day 3 of storage, and the highest pH values were recorded in the CON

patty samples which increased from 5.69 on day 3 to 7.10 on day 9 followed by the pH of PG beef patties presenting pH values ranging from 5.78 to 7.04 on 3rd day and on 9th day, respectively. Thus, propyl gallate as synthetic antioxidants did not show any effect on pH. The pennyroyal powder addition to beef patties significantly ($P < 0.05$) slowed the rate of pH increase and on days 6 and 9 of storage, P225, and P300 patties exhibited the lowest pH values. Consequently, the addition of pennyroyal powder significantly enhanced the pH stability of the patties simultaneously with the

level of pennyroyal powder suggesting the protective role of pennyroyal against spoilage microorganisms. The increase in pH could be due to the degradation of nitrogenous components in beef patties during the storage period. This process was directly influenced by the action of endogenous or microbial enzymes such as proteases or lipases (Danowska-Oziewicz and Kurp, 2017; Morsy et al., 2018; Villasante et al.,

2020). Similarly, Ikhlas et al. (2012) reported an increase in the pH value in *Cosmos caudatus*, *Polygonum minus*, and BHT treated quail meatballs during the refrigeration storage. Also, Villasante et al. (2020) reported a significant increase in the pH of beef patties including different combinations of pecan shells, rosella flowers, and red pepper during the storage period.

Table 3. Changes in pH and TBARS values of beef patties formulated with different levels of pennyroyal powder during storage at 4 °C¹

Parameters	Batches	Storage period (days)			
		0	3	6	9
pH	CON ²	5.87±0.17 ^{aC}	5.69±0.27 ^{aC}	6.38±0.07 ^{bB}	7.10±0.14 ^{aA}
	PG ³	5.84±0.21 ^{aC}	5.78±0.27 ^{aC}	6.36±0.03 ^{bB}	7.04±0.16 ^{abA}
	P075 ⁴	5.91±0.18 ^{aC}	5.68±0.18 ^{aC}	6.57±0.09 ^{aB}	6.84±0.24 ^{abA}
	P150 ⁵	5.93±0.13 ^{aC}	5.53±0.11 ^{aD}	6.33±0.27 ^{bB}	6.77±0.30 ^{ba}
	P225 ⁶	5.85±0.02 ^{aB}	5.58±0.05 ^{aC}	5.85±0.02 ^{cB}	6.08±0.01 ^{cA}
	P300 ⁷	5.85±0.02 ^{aB}	5.61±0.01 ^{aD}	5.74±0.05 ^{cC}	5.99±0.01 ^{cA}
TBARS (mg MDA/kg)	CON ²	1.43±0.56 ^{aC}	3.36±0.13 ^{aAB}	3.12±0.86 ^{aB}	4.06±0.51 ^{aA}
	PG ³	0.73±0.46 ^{bB}	1.00±0.16 ^{dB}	1.50±0.31 ^{ba}	1.76±0.14 ^{cA}
	P075 ⁴	1.35±0.17 ^{aB}	1.29±0.10 ^{cdB}	1.63±0.41 ^{ba}	2.32±0.19 ^{ba}
	P150 ⁵	1.77±0.22 ^{aB}	1.26±0.07 ^{cdC}	1.37±0.17 ^{bBC}	2.61±0.53 ^{ba}
	P225 ⁶	1.39±0.43 ^{aB}	2.50±0.10 ^{ba}	1.78±0.20 ^{ba}	1.79±0.17 ^{cB}
	P300 ⁷	1.85±0.19 ^{aAB}	1.54±0.44 ^{cC}	1.71±0.76 ^{baB}	2.41±0.27 ^{ba}

¹Values are presented as the mean ± standard deviation of duplicate samples. Means not sharing a common superscript a, b, c or d in a column or A, B, C or D in a row are significantly different at $P < 0.05$ as assessed by Duncan's multiple range test.

²CON - negative control sample.

³PG - positive control sample with 0.01% propyl gallate.

⁴P075 - sample with 0.75% pennyroyal powder.

⁵P150 - sample with 1.5% pennyroyal powder.

⁶P225 - sample with 2.25% pennyroyal powder.

⁷P300 - sample with 3.0% pennyroyal powder.

As seen in Table 3, the addition of pennyroyal powder showed a significant effect on TBARS of beef patties ($P < 0.05$). At the beginning of storage, the lowest TBARS value was determined in the PG samples ($P < 0.05$), while CON and patties containing pennyroyal powder exhibited similar TBARS values ($P > 0.05$); however, the PG and patties containing pennyroyal powder revealed a noticeable decrease in TBARS value compared to the CON samples in other storage periods ($P < 0.05$). On day 9 of storage, the TBARS values of all patty samples increased compared to the beginning of storage, but the rate of increase was considerably slower in PG and

beef patties containing pennyroyal powder compared to the CON samples. On day 9 of storage, the lowest TBARS values were determined in PG and P225 samples. Similarly, other patty samples containing pennyroyal powder also exhibited lower TBARS value than the CON samples, thus indicating high protection of pennyroyal powder against lipid oxidation in beef patties. These results are also supported by phenolic content and antioxidant capacity results of pennyroyal powder (Table 1). The antioxidative effect of pennyroyal powder could be explained by phenolics such as kaempferol-3-O-rutinoside, quercetagenin-3,6-dimethylether,

fumaric acid, chlorogenic acid, apigenin, and epicatechin present in pennyroyal. These phenolic components have multifunctional properties and can act as ROS scavengers, singlet oxygen scavengers, reducing agents, and hydrogen atom donors. Additionally, phenolics especially flavonoids are capable of metal chelating and reducing abilities (Gülçin et al., 2020). Similarly, Kamkar et al. (2010) observed that water and methanol extracts of *Mentha pulegium* are able to inhibit both primary and secondary oxidation of sunflower oil during storage.

P075 and P150 on 3rd day, all patties containing pennyroyal on 6th day, and P225 on 9th day of storage showed similar TBARS values to those treated with PG ($P > 0.05$) (Table 3). Similar to our results, Kamkar et al. (2010) reported that the

protection offered by water and methanol extracts of *Mentha pulegium* is comparable to widely used synthetic antioxidant BHT and it can be added to the commercial vegetable oils as a natural antioxidant. Therefore, the present study results indicate that pennyroyal powder can be considered as a natural antioxidant to prevent lipid oxidation in beef patties.

Instrumental color parameters of beef patties with pennyroyal powder during storage

The instrumental color parameters of the beef patties formulated with pennyroyal powder during storage at 4 °C are given in Table 4. As seen, the addition of pennyroyal powder showed a significant effect on *L*, *a* and *b* values of the samples ($P < 0.05$).

Table 4. Changes in color parameters of beef patties formulated with different levels of pennyroyal powder during storage at 4 °C¹

Parameters	Batches	Storage period (days)			
		0	3	6	9
<i>L</i>	CON ²	42.51±3.47 ^{aA}	45.08±3.82 ^{aA}	43.37±3.11 ^{aA}	42.26±5.53 ^{aA}
	PG ³	44.74±4.41 ^{aA}	44.13±3.66 ^{abA}	41.39±2.34 ^{bA}	42.26±1.61 ^{aA}
	P075 ⁴	43.79±1.52 ^{aA}	41.92±0.44 ^{bB}	38.30±0.84 ^{cC}	37.65±0.85 ^{bC}
	P150 ⁵	39.31±3.04 ^{bA}	38.03±2.75 ^{cAB}	36.63±2.14 ^{cB}	35.91±1.46 ^{bB}
	P225 ⁶	39.14±1.40 ^{bA}	37.68±0.69 ^{cB}	36.50±1.13 ^{cC}	35.61±0.85 ^{bC}
	P300 ⁷	35.87±2.60 ^{cA}	33.69±2.94 ^{dAB}	34.38±2.51 ^{dAB}	32.63±1.48 ^{cB}
	<i>a</i>	CON ²	15.16±1.19 ^{bA}	12.17±3.87 ^{aB}	14.15±2.03 ^{aAB}
PG ³		16.34±1.66 ^{aA}	11.23±1.99 ^{aB}	11.22±2.02 ^{bB}	10.04±2.82 ^{bB}
P075 ⁴		9.58±0.79 ^{cA}	3.89±0.55 ^{bC}	7.26±1.13 ^{cB}	7.13±1.91 ^{cB}
P150 ⁵		3.82±0.34 ^{dB}	2.96±0.50 ^{bC}	5.10±1.37 ^{dA}	5.71±0.81 ^{cA}
P225 ⁶		3.25±0.31 ^{dB}	2.62±0.37 ^{bC}	2.83±0.37 ^{cC}	3.92±0.63 ^{dA}
P300 ⁷		1.93±0.32 ^{eB}	2.15±0.34 ^{bB}	3.26±0.45 ^{eA}	3.30±0.49 ^{dA}
<i>b</i>		CON ²	11.31±1.05 ^{abA}	10.49±1.16 ^{abAB}	9.57±1.05 ^{aBC}
	PG ³	12.04±1.03 ^{aA}	10.28±1.17 ^{abB}	8.43±1.67 ^{bC}	7.65±1.28 ^{dC}
	P075 ⁴	11.67±0.54 ^{abA}	11.16±0.77 ^{aB}	9.72±0.24 ^{aC}	9.53±0.39 ^{bcC}
	P150 ⁵	10.90±0.76 ^{bcA}	10.72±0.84 ^{aA}	10.01±0.53 ^{aB}	10.41±0.39 ^{aAB}
	P225 ⁶	11.35±0.41 ^{abA}	10.42±0.21 ^{abB}	10.07±0.31 ^{aC}	9.67±0.34 ^{bD}
	P300 ⁷	10.31±0.80 ^{cA}	9.65±0.88 ^{bAB}	9.77±0.79 ^{aAB}	9.19±0.71 ^{bcB}

¹Values are presented as the mean ± standard deviation of duplicate samples. Means not sharing a common superscript a, b, c, d or e in a column or A, B, C or D in a row are significantly different at $P < 0.05$ as assessed by Duncan's multiple range test.

²CON - negative control sample.

³PG - positive control sample with 0.01% propyl gallate.

⁴P075 - sample with 0.75% pennyroyal powder.

⁵P150 - sample with 1.5% pennyroyal powder.

⁶P225 - sample with 2.25% pennyroyal powder.

⁷P300 - sample with 3.0% pennyroyal powder.

The incorporation of different levels of pennyroyal powder to beef patties reduced the lightness (L) and redness (a) values of formulated patties compared to the CON and PG, and values further reduced with increasing pennyroyal powder level. Thus, the beef patties formulated with more pennyroyal powder became darker and greenish in color. This decline in lightness and redness could be attributed to the natural color of pennyroyal powder, ranging from light green to deep green, which depends on drying conditions. Similarly, Choe et al. (2011) reported that the addition of lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) powder and barley leaf (*Hordeum vulgare*) powder to raw minced pork caused lower L and a values compared to the control samples over the storage time. While L values of CON and PG samples did not change during storage, those of beef patties containing pennyroyal powder decreased. This decrease could be related to the presence of antioxidant compounds in pennyroyal powder retarding metmyoglobin formation in beef patties. However, the a values of the CON, PG and P075 samples decreased compared to the beginning of the storage but those of samples containing pennyroyal powder slightly increased. Like the lightness results, the redness values also confirm that the antioxidant compounds in pennyroyal powder retarded myoglobin oxidation. On day 9 of storage, all beef patty samples exhibited lower b values compared to the beginning of storage. Similar results were also reported by various authors (Hawashin et al., 2016; Prommachart et al., 2020; Bellucci et al., 2021).

CONCLUSION

Our findings showed that the pennyroyal powder is a natural source of phenolic compounds and has potent antioxidant properties in two bioanalytical assays including DPPH scavenging activity and FRAP. Although the addition of pennyroyal powder to beef patties decreased the protein content and increased the ash content, the proximate composition of all patties was within the limits of the Turkish Uncooked Meatball Standard (TSE 10581, 2007). The inclusion of pennyroyal powder to the beef patties improved cooking loss, but adversely affect the hardness and overall acceptability. However, the addition

of pennyroyal powder to beef patties at a level up to 1.5% did not affect the flavor and overall acceptability compared to control samples. Also, the addition of pennyroyal powder into beef patties improved the pH, lipid, and color stability during 9 days of cold storage. Thus, pennyroyal powder could be used in beef patties at 1.5% concentration to retard the lipid and color oxidation with minimal compositional, textural, and sensory changes.

CONFLICT OF INTEREST

There are no possible conflicts of interest between the authors.

AUTHOR CONTRIBUTION

This study was derived from Farida Guliyeva's Master's thesis and Sadettin Turhan contributed as the thesis supervisor in conducting analyzes, statistical analyses of data, writing the article, and writing-review-proofreading-publishing procedures. The Master's thesis student Farida Guliyeva carried out the preparation of samples, analyses, reporting, and writing and correction of literature sources. The authors have read and approved the final version of the article.

REFERENCES

- Alakali, J.S., Irtwange, S.V., Mzer, M.T. (2010). Quality evaluation of beef patties formulated with bambara groundnut (*Vigna subterranean* L.) seed flour. *Meat Sci*, 85: 215-223.
- AOAC (2000). *Official methods of analysis* (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists, AOAC International, Washington, DC.
- Aykin Dinçer, E., Kiliç Büyükkurt, Ö., Candal, C., Bilgiç, B.F., Erbaş, M. (2018). Investigation of the usability of retrograded flour in meatball production as a structure enhancer. *Korean J Food Sci An*, 38: 78-87.
- Bellucci, E.R.B., Munekata, P.E.S., Pateiro, M., Lorenzo, J.M., Barretto, A.C.S. (2021). Red pitaya extract as natural antioxidant in pork patties with total replacement of animal fat. *Meat Sci*, 171: 108284.

- Bilek, A.E., Turhan, S. (2009). Enhancement of the nutritional status of beef patties by adding flaxseed flour. *Meat Sci*, 82: 472-477.
- Choe, J.H., Choi, J.H., Choi, Y.S., Han, D.J., Kim, H.Y., Lee, M.A., Kim, S.Y., Kim, C.J. (2011). Antioxidant properties of lotus leaf (*Nelumbo nucifera*) powder and barley leaf (*Hordeum vulgare*) powder in raw minced pork during chilled storage. *Korean J Food Sci An*, 31(1): 32-39.
- Çelik, S.E., Tufan, A.N., Bekdeşer, B., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R. (2017). Identification and Determination of Phenolics in *Lamiaceae* Species by UPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J Chromatogr Sci*, 55(3): 291-300.
- Danowska-Oziewicz, M., Kurp, L. (2017). Physicochemical properties, lipid oxidation and sensory attributes of pork patties with lupin protein concentrate stored in vacuum, modified atmosphere and frozen state. *Meat Sci*, 131: 158-165.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A., Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: Application in beef meatballs. *Meat Sci*, 69: 371-380.
- Gao, X., Björk, L., Trajkovski, V., Uggla, M. (2000). Evaluation of antioxidant actives of rosehip ethanol extracts in different test systems. *J Agric Food Chem*, 80: 2021-2027.
- Gülçin, İ., Gören, A., Taslimi, P., Alwasel, S.H., Kılıç, O., Bursal, E. (2020). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*)-analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. *Biocatal Agric Biotechnol*, 23: 101441.
- Hautrive, T.P., Piccolo, J., Rodrigues, A.S., Campagnol, P.C.B., Kubota, E.H. (2019). Effect of fat replacement by chitosan and golden flaxseed flour (wholemeal and defatted) on the quality of hamburgers. *LWT - Food Sci Technol*, 102: 403-410.
- Hawashin, M.D., Al-Juhaimi, F., Ahmed, I.A.M., Ghafoor, K., Babiker, E.E. (2016). Physicochemical, microbiological and sensory evaluation of beef patties incorporated with destoned olive cake powder. *Meat Sci*, 122: 32-39.
- Huang, S.C., Shiau, C.Y., Liu, T.E., Chu, C.L., Hwang, D.F. (2005). Effects of rice bran on sensory and physico-chemical properties of emulsified pork meatballs. *Meat Sci*, 70(4): 613-619.
- Ikhlas, B., Huda, N., Ismail, N. (2012). Effect of *Cosmos caudatus*, *Polygonum minus* and BHT on physical properties, oxidative process, and microbiology growth of quail meatball during refrigeration storages. *J Food Process Preserv*, 36: 55-66.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandl, S., Bauer, F. (2006). The oxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat Sci*, 72: 446-456.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandl, S., Bauer, F. (2007). The effect of dried galangal powder and its ethanolic extracts on oxidative stability in cooked ground pork. *LWT - Food Sci Technol*, 40(2): 324-330.
- Kamkar, A., Javan, A.J., Asadi, F., Kamalinejad, M. (2010). The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem Toxicol*, 48: 1796-1800.
- Morsy, M.K., Mekawi, W., Elsabagh, R. (2018). Impact of pomegranate peel nanoparticles on quality attributes of meatballs during refrigerated storage. *LWT - Food Sci Technol*, 89: 489-495.
- Nakajima, J., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *J Biomed Biotechnol*, 5: 241-247.
- Öztürk, T., Turhan, S. (2020). Physicochemical properties of pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seed kernel flour and its utilization in beef meatballs as a fat replacer and functional ingredient. *J Food Process Preserv*, 44(9): e14695.
- Prommachart, R., Belem, T.S., Uriyapongson, S., Rayas-Duarte, P., Uriyapongson, J., Ramanathan, R. (2020). The effect of black rice water extract on surface color, lipid oxidation, microbial growth, and antioxidant activity of beef patties during chilled storage. *Meat Sci*, 164: 108091.

- Ran, M., Chen, C., Li, C., He, L., Zeng, X. (2020). Effects of replacing fat with *Perilla* seed on the characteristics of meatballs. *Meat Sci*, 161: 107995.
- Saraiva, B.R., Agostinho, B.C., Vital, A.C.P., Staub, L., Pintro, P.T.M. (2019). Effect of brewing waste (malt bagasse) addition on the physicochemical properties of hamburgers. *J Food Process Preserv*, 43(10): e14135.
- Selani, M.M., Shirado, G.A.N., Margiotta, G.B., Rasera, M.L., Marabesi, A.C., Piedade, S.M.S., Contreras-Castillo, C.J., Canniatti-Brazaca, S.G. (2016). Pineapple by-product and canola oil as partial fat replacers in low-fat beef burger: Effects on oxidative stability, cholesterol content and fatty acid profile. *Meat Sci*, 115, 9-15.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *J Funct Foods*, 18: Part B, 820-897.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic and phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Viticult*, 16(3): 144-158.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva, J.A., Nunes, M.L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Ind Crops Prod*, 36: 81-87.
- TSE 10581 (2007). *Turkish Uncooked Meatball Standard, TSE 10581*. Turkish Standards Institution, Ankara.
- Turhan, S., Sagir, I., Ustun, N. S. (2005). Utilization of hazelnut pellicle in low-fat beef burgers. *Meat Sci*, 71: 312-316.
- Turhan, S., Yazici, F., Saricaoglu, F.T., Mortas, M., Genccelep, H. (2014). Evaluation of the nutritional and storage quality of meatballs formulated with bee pollen. *Korean J Food Sci An*, 34: 423-433.
- Villasante, J., Ouerfelli, M., Bobet, A., Metón, I., Almajano, M. P. (2020). The Effects of pecan shell, roselle flower and red pepper on the quality of beef patties during chilled storage. *Foods*, 9: 1692.
- Witte, V.C., Krause, G.F., Bailey, M.E. (1970). A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage. *J Food Sci*, 35: 582-585.



ÇİLEK AROMASININ DEPOLAMA KARARLILIĞI ÜZERİNE PÜSKÜRTEREK KURUTMA YÖNTEMİYLE ENKAPSÜLASYON İŞLEMİNİN ETKİSİ VE MİKROKAPSÜLLERİN MODEL GIDALARDA ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Ferhan Balcı-Torun*, Feramuz Özdemir

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

Geliş / *Received*: 14.03.2021; Kabul / *Accepted*: 05.05.2021; Online baskı / *Published online*: 10.05.2021

Balcı-Torun, F., Özdemir, F. (2021). Çilek aromasının depolama kararlılığı üzerine püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyon işleminin etkisi ve mikrokapsüllerin model gıdalarda etkinliğinin belirlenmesi. *GIDA* (2021) 46 (3) 751-765 doi: 10.15237/gida. GD21070

Balcı-Torun, F., Özdemir, F. (2021). Influence of the spray-drying encapsulation on the storage stability of strawberry aroma and efficiency of microcapsules in model foods. GIDA (2021) 46 (3) 751-765 doi: 10.15237/gida. GD21070

ÖZ

Çalışmada sıvı çilek aroması püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsüle edilmiş ve elde edilen mikrokapsüllerin depolama stabilitesi ve model gıdalarda kullanım etkinliği belirlenmiştir. Bu amaçla mikrokapsüller farklı sıcaklıklarda (4 ve 25 °C) 60 gün süre ile depolanmış ve aroma salınımı, nem miktarı, su aktivitesi, kitle yoğunluğu ve parçacık boyutu dağılımı analizleri yapılmıştır. Ayrıca ticari sıvı ve enkapsüle çilek aromaları kullanılarak üretilen çikolata ve keklerde duyu analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçları enkapsülasyon işleminin aroma salınımını yaklaşık %50 oranında azalttığını, düşük sıcaklıklardaki depolamanın aroma korunumunu daha iyi sağladığını göstermiştir. z mikrokapsüllerin nem miktarı, su aktivitesi ve parçacık boyutu değerleri depolama süresi ile birlikte artış gösterirken, kitle yoğunluğu değerinin azaldığı tespit edilmiştir. Duyusal analiz sonucunda enkapsüle çilek aromaları ile üretilen çikolata ve keklerin koku, tat, aroma ve genel beğeni açısından sıvı formda aroma kullanılarak üretilen ürünlere göre daha çok beğenildiği belirlenmiştir. Sonuçlar enkapsülasyon işleminin depolama stabilitesini arttırmasının yanında katkılanıldığı gıdaların işlenmesi sırasındaki kararlılıklarını da geliştirdiğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Aroma, çilek, enkapsülasyon, püskürterek kurutma, depolama, model gıda

INFLUENCE OF THE SPRAY-DRYING ENCAPSULATION ON THE STORAGE STABILITY OF STRAWBERRY AROMA AND EFFICIENCY OF MICROCAPSULES IN MODEL FOODS

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the storage stability and usage into model foods of strawberry aroma microcapsules obtained by spray-drying method. Accordingly, microcapsules were stored at different temperatures (4 and 25 °C) for 60 days and aroma release, moisture content, water activity, bulk density and particle size distribution analyses were performed. Sensory analysis was performed on chocolate and cakes produced with liquid form and encapsulated strawberry flavors. While the moisture content, water activity and particle size values of the powder microcapsules increased by

* Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*;

✉ ferhan85@hotmail.com,

☎ (+90) 242 310 6520

☎ (+90) 242 310 6306

Ferhan Balcı-Torun; ORCID no: 0000-0002-8972-1087

Feramuz Özdemir; ORCID no: 0000-0001-6618-2896

the storage time, bulk density value decreased. As a result of the sensory analysis, it was determined that chocolate and cakes produced with encapsulated strawberry flavors were more appreciated than the products produced using aroma in liquid form. These results indicated that the encapsulation process not only increases the storage stability in terms of flavor, but also improves the stability during processing of the foods.

Keywords: Aroma, strawberry, encapsulation, spray drying, storage, model food

GİRİŞ

İnsanoğlunun gıdaların tat, lezzet ve aromasını korumak ve geliştirmek için yüzyıllardır sürdürdüğü çabası günümüzde de artarak devam etmektedir. Bu amaçla özellikle gıdaların işlenmesi ve depolanması sürecinde azalan, değişen veya oluşan tat ve aromanın gıdaya kazandırılması amacıyla gıda katkıları olarak aroma maddeleri kullanılmaktadır (Torun ve Özdemir, 2011). Aroma bileşenleri oda sıcaklığında uçucu fazında olan ve burun boşluğundaki koku reseptörleri ile etkileşime giren uçucu moleküller olarak tanımlanmaktadır (Zuidam ve Heinrich, 2010). Birçok uçucu organik molekülden oluşan aroma maddeleri 50-600 Da aralığında değişen düşük molekül ağırlığına sahip olup, alkoller, karboniller, asitler, esterler, laktonlar ve fenoller gibi bileşenlerin farklı reaksiyonları sonucu meydana gelmektedir (Atak, 2018). Amino asitlerden oluşan aldehit ve ketonlar ile bunların dönüşümü esnasında meydana gelen alkoller aroma oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Aroma maddelerinden bir diğer önemli grubu olan esterler ise genellikle meyvelerin karakteristik aroma tanımlamasından sorumludur. Örneğin etil esterleri “etil asetat” bileşeninden başlayıp uzun zincirlerle “etil lorat” bileşenine kadar devam eden meyve aromasından ve aromanın yoğunluğundan sorumlu bileşenlerdir (Rowe, 2005; Gonçalves vd., 2018).

Geçmişte bitkisel kaynaklardan özütlenerek kullanılan aroma maddeleri, yapılarının belirlenmesiyle birlikte kimyasal olarak sentezlenmeye başlanmıştır. Günümüzde kullanılan aroma katkılarının %80'inden fazlası sentetik olarak elde edilmektedir (Longo ve Sanroman, 2006). Tüketime sunulan işlenmiş gıdalar incelendiğinde, bunların birçoğunda çilek, muz, karpuz, vanilya, nane, limon, fındık, kahve ve kakao gibi aroma maddelerinin kullanıldığı görülmektedir. Bunlar arasında çilek aromasının yaygın olarak kullanıldığı dikkat çekmektedir.

Çilek aromasında 300'den fazla aroma bileşeninin bulunduğu ve ana bileşenlerinin esterler, asitler, aldehitler, alkoller ve terpenlerden meydana geldiği görülmüştür (Zabetakis ve Holden, 1997). Aromaya katkıda bulunan diğer gruplar arasında kükürt bileşikleri, asetaller, furanlar, fenoller, epoksitler ve hidrokarbonlar bulunmaktadır. Bunlar arasında metil, etil ester, furanonlar, C6-bileşiği aldehitleri ve C6-türevi bileşikler, çilek aromasından sorumlu aroma maddeleri olarak kabul edilmektedir (Schieberle ve Hofmann, 1997; Zabetakis ve Holden, 1997; Zabetakis vd., 1999; Pelayo vd., 2003).

Aroma maddeleri fiziksel özelliklerine göre çeşitlilik göstermekle birlikte genellikle katı, sıvı veya macunumsu formda olup fiziksel formu genellikle katılanacak ürüne uygunluğu veya kullanım amacına göre değişmektedir. Sıvı formdaki bir ürüne katı formda bulunan bir aroma, kuru toz bir ürün karışımında da sıvı aroma maddesinin kullanımında teknolojik sıkıntılar yaşanabilmektedir. Gıda katkı maddeleri arasında fiyatları oransal olarak yüksek olan aroma maddelerinin depolama stabilitelerini arttırmak, işlenmeleri ve tüketimleri sırasındaki salınımlarının kontrolünü sağlamak oldukça önemlidir. Son yıllarda, gıda endüstrisinde oksijen, nem, sıcaklık, ışık ve benzeri çevre koşullarına karşı koruma sağlayan ve aktif bileşenin doğru yerde, doğru zamanda kontrollü salınımına olanak veren enkapsülasyon uygulamaları gittikçe yaygınlaşmaktadır. Özellikle gıda etken bileşenlerinin, renk maddelerinin, enzimlerin, vitaminlerin, minerallerin, aroma gibi katkı maddelerinin ve yararlı mikroorganizmaların enkapsülasyonuna yönelik çalışmaların yapıldığı görülmektedir (Gibbs vd., 1999; Zuidam ve Heinrich, 2010; Zhu vd., 2012). Hassas bir maddenin veya karışımın, koruyucu bir kabuk veya duvar oluşturabilen başka bir maddenin veya karışımın içerisine hapsedilmesi veya tutulması olarak tanımlanan enkapsülasyon işlemi

püskürterek kurutma, püskürterek soğutma, dondurarak kurutma, ekstrüzyon kaplama, akışkan yatakta kaplama, lipozoma hapsedme ve koaservasyon gibi farklı tekniklerle yapılabilmektedir (Madene vd., 2006). Gıda endüstrisinde aroma maddelerinin enkapsülasyonunda kullanılan teknikler içinde en yaygın olanı püskürterek kurutma yöntemidir. Sürekli üretim olanağı, ekipman kullanımının kolaylığı, düşük maliyet, geniş taşıyıcı madde seçimi, uçucu bileşenlerin iyi tutulması ve son ürün stabilitesi bu yöntemin en çok tercih edilme nedenleridir (Re, 1998; Jimenez vd., 2004; Rodriguez-Huezo vd., 2004). Püskürterek kurutmada kapsüllenecek olan aroma damlacıklarının, küresel partiküllerin katı çepeleri içinde hapsedilmesi amaçlanmaktadır. Bu işlem, kaplama materyali belli bir konsantrasyonun üzerinde iken, uçucu bileşiklerin partikül yüzeyine kadar yeterince hareket edemeyeceği ve atmosfere salınmayacağı teorisi üzerine kurulmuştur. Bu nedenle püskürterek kurutma esnasında su ortamdan uzaklaşırken, taşıyıcı madde yüzeyde konsantre olmakta ve yüzeyde ileri derecede aroma kaybını önlemek üzere etkili bir sızdırmazlık oluşturmaktadır (Bhandari ve Howes, 1999; Zeller vd., 1999; Kargel, 2000). Püskürterek kurutma ile elde edilen mikrokapsüllerin boyutu 0.2- 5000 µm arasında değişmekte olup, kullanılan kapsülleme materyaline ve hazırlanma prosedürüne bağlı olarak mikrokapsüller çok farklı şekilde oluşabilmektedir (Krishnan vd., 2005). Mikrokapsülasyon işleminde kullanılacak olan kaplama materyali seçimi işlemin başarısını etkileyen önemli bir unsur olmakla birlikte; kaplama materyali çekirdek materyalini dış etkilere karşı bariyer görevi görerek korumak ve herhangi başka bir bileşenle reaksiyona girmesini engellemekle görevlidir. Bununla birlikte kaplama istenilen çözgüde çözünebilmeli ve çekirdek materyalini çok iyi kaplayarak hem ürünün işlenmesi hem de depolanması sırasında koruyabilme özelliğine sahip olmalıdır. Aynı zamanda istenilen koşullarda çekirdek materyalinin salınımını kolaylaştırırken, düşük maliyetli, tatsız ve temini kolay olmalıdır. Ancak bütün bu özelliklerin tek bir materyal ile sağlanması oldukça güç olduğu için

enkapsülasyon işleminde farklı kaplama materyallerinin bir arada kullanılması önerilmektedir (Koç vd., 2010). Maltodekstrin ve modifiye nişasta gibi karbonhidratlar taşıyıcı madde veya duvar materyali olarak sıklıkla kullanılan, ucuz, yüksek konsantrasyonlarda düşük viskozite gösteren, yüksek çözünürlüğe sahip, oksidasyona duyarlı maddelerdir. Halkalı yapıdaki oligosakkaritler olan siklodekstrinler, gıda endüstrisinde pek çok kullanım alanı bulunmakla birlikte, özellikle aroma ve renk maddelerinin, vitaminlerin ve doymamış yağların kapsüllenmesi, ayrıca gıdaların duysal ve besleyici özelliklerinin artırılması için kullanılmaktadır. Bitki salgısı olan arabik gam suda son derece iyi çözünebilmesi (\geq %50) nedeniyle diğer doğal gam maddelerinden ayrılmaktadır. Arabik gam gıdalarda özellikle aroma koruyucu, köpük stabilizatörü, bağlayıcı, emülgatör ve stabilizatör olarak kullanılmaktadır (Burdock, 1998). Modifiye nişastalar, yapısına lipofilik süksinik asit eklenerek emülsifiye edici özellik kazandırılmış hidrolize nişastalardır. Modifiye nişastalar, yapışkanlık, bağlama, kaplama, toparlama, emülsiyon stabilizasyonu, jelleşme, şeffaflık, nem tutma, stabilizasyon ve kıvam artırıcılık gibi özelliklerinden dolayı gıdalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Karaoğlu ve Kotancılar, 1998).

Literatürde çilek aromasının püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyonu konu alan az sayıda çalışma (Pellicer vd., 2018; Balcı-Torun ve Özdemir, 2021) mevcut olup, püskürterek kurutulmuş toz aroma mikrokapsüllerinin depolama stabilitesinin incelendiği bir çalışmaya ise rastlanılamamıştır. Nitekim bu makalede tarafımızdan yapılan çalışma sonucunda (Balcı-Torun ve Özdemir, 2021) belirlenen optimum şartlarda üretilen toz çilek mikrokapsüllerinin depolama stabilitesinin ve bazı model gıdalardaki kullanımının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla %16.12 modifiye nişasta, %9.76 arabik gam, %4.12 çözünür lif, %1 β -siklodekstrin taşıyıcı madde karışımı kullanılarak, 190 °C giriş sıcaklığında kurutulmuş üretilen toz çilek mikrokapsülleri farklı 2 sıcaklıkta (4 ve 25 °C) 60 gün süreyle depolanmış ve depolama periyodunda örneklerin aroma salınımları ile su aktivitesi, nem

değeri, kitle yoğunluğu ve parçacık boyutundaki değişimler incelenmiştir. Ayrıca üretilen mikrokapsüllerle çikolata ve kek üretimleri yapılarak ürünlerin beğeni durumları da belirlenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan doğal sıvı aroma maddesi Aromsa Besin Aroma ve Katkı Maddeleri Sanayi Ticaret A.Ş. (Gebze, Kocaeli) firmasından temin edilmiştir. Enkapsülasyon işleminde kullanılan taşıyıcı materyaller olan maltodekstin ve Nutriose çözünür lif, Cleargum modifiye nişasta "Roquette Frères" (Lestrem, Fransa) firmasından, model gıda üretiminde kullanılan çikolata ise Callebaut (Belçika) firmasından temin edilmiştir. Analizlerde kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta Sigma-Aldrich' den (Darmstadt, Almanya) temin edilmiştir.

Enkapsülasyon işlemi

Çilek aromasının enkapsülasyon işlemi Balcı-Torun ve Özdemir (2021)'in belirttiği optimum şartlara göre mini püskürtmeli kurutucuda (Büchi Mini Spray Dryer B-290, Flawil, İsviçre) gerçekleştirilmiştir. Kurutma işleminde taşıyıcı madde karışımı %31 (ağırlık/hacim) olarak hazırlanmış, bu karışıma kuru maddenin %10' u kadar çilek aroması ilave edilmiştir. Taşıyıcı madde karışımını ise %16.12 modifiye nişasta, %9.76 arabik gam, %4.12 çözünür lif ve %1 β -siklodekstrin oluşturmuş olup su içerisinde çözüldürülmüştür. Kurutma öncesinde karışım 17000 d/dk hızda 5 dakika süreyle homojenizatör yardımı ile (Ultraturrax T25 Basic Staufen, Almanya) homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım hava giriş sıcaklığı 190 °C, ürün çıkış sıcaklığı 75-80 °C, besleme hızı 5-8 mL/dk ve aspirasyon hızı 30 m³/sn koşullarında püskürtmeli kurutucuyla toz ürüne dönüştürülmüştür.

Aroma mikrokapsüllerinin depolanması

Çilek aroması mikrokapsülleri ve enkapsülasyon işlemi uygulanmamış sıvı formdaki aromalar (kontrol örnekleri) amber renkli cam kavanozlara, her bir kavanoza 15' er gram olacak şekilde koyularak örnekler 4 ve 25 °C sıcaklıkta 2 ay süre depolanmıştır. Depolamanın 0., 15., 30. ve 60.

günlerinde alınan örneklerde nem miktarı, su aktivitesi, aroma profili, partikül boyutu ve yığın yoğunluğu analizleri , sıvı örnekte ise aroma analizi yapılmıştır.

SPME/GC-MS ile aroma analiz koşulları

Sıvı ve toz formdaki örneklerin aroma analizleri Balcı-Torun ve Özdemir (2021) tarafından belirtilen analiz şartları kullanılarak, GC-MS (QP2010-Ultra, Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazı ile yapılmış, analiz sırasında cihazın Katı Faz Mikroekstraksiyon tekniği (SPME) kullanılarak ekstraksiyon ünitesi (AOC-5000Auto Sampler, Shimadzu, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Aroma analiz sonuçları % alan cinsinden hesaplanmış olup, uçucu bileşenlerinin tanımlanması C₇-C₂₄ alkan standardının metotta yürütülmesi ile elde edilen tutunma indeksi (Kovats'Index) sonuçları ile cihaz yazılımı (GC-MS solution 5.60) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca yazılım tarafından tanımlanan bileşenlerin kontrolünde bilimsel makaleler ile Wiley 10 ve NIST 02 kütüphanelerindeki alıkonma indekslerinden de yararlanılmıştır.

Örneklerin aroma profil analizi 100µm PDMS fiber ile SPME metoduna göre yapılmıştır. SPME metodunda işlem sıcaklığı 40 °C, ekstraksiyon süresi 15 dakika, karıştırma hızı 250 d/dk (5 s açık, 2 s kapalı), desorpsiyon süresi ise 10 dakika olarak ayarlanmıştır. GC-MS analizinde TRB5-MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) kolon kullanılmış olup fırın sıcaklık programı 40 °C'de 5 dk bekleme, 4 °C/dk artışla 100 °C' ye yükselme ve bu sıcaklıkta 3 dk bekleme, 10 °C/dk artışla 200 °C' ye yükselme ve bu sıcaklıkta 3 dk bekleme olarak belirlenmiştir. GC-MS' te dedektör sıcaklığı 275 °C, taşıyıcı gaz helyum (1.78 mL/dk), enjeksiyon ve iyon kaynağı sıcaklığı 200 °C, kütle aralığı 30-500 m/z ve tarama hızı 1000 kütle/s' dir. Çizelge 1'de çilek aromasının ve aroma mikrokapsüllerinin değerlendirilmesinde kullanılan bileşenler ve bileşenlerin literatürde yapılan tanımlamaları verilmiştir (Jetti vd., 2007; Galmarini vd., 2011; Schieberle vd., 2015; Balcı-Torun ve Özdemir, 2021). Sıvı çilek aromasında ve aroma kapsüllerinde depolama süresindeki değişiminin incelenmesinde bu başlıca bileşenler göz önünde bulundurulmuştur.

Çizelge 1. Çilek aromasında tanımlanan bileşenler (Jetli vd. 2007; Galmarini vd. 2011; Schieberle vd. 2015; Balci-Torun ve Özdemir 2021)

Table 1. Flavor components described in strawberry (Jetli et al. 2007; Galmarini et al. 2011; Schieberle et al. 2015; Balci-Torun and Özdemir 2021)

Bileşen Compound	Aroma tanımlaması Definition
1-Hexanol	Meyvemsi, tatlı, yeşilimsi koku
2-Hexanol	Meyvemsi, tatlı, muz,
2-Hexen-1-ol, acetate	Meyvemsi, elma, armut, ekşi
3-Hexen-1-ol	Tatlı yeşil, hafif meyveli
3-Hexen-1-ol, acetate	Meyvemsi, muz, elma, armut, tropik
Ethyl butanoate*	Meyveli, çilek, elma kayısı, muz erik
Ethyl 2-metylbutanoate*	Meyveli, taze, meyve, üzüm, ananas, çilek mango ve kiraz notaları
Ethyl 3-metylbutanoate*	Tatlı, meyveli, keskin, ananas, çilek, elma yeşili portakal
Ethyl hexanoate*	Tatlı, meyveli, ananas, çilek, yağlı ve yeşil muzlu bir nüans
1-Butanol, 3-methyl-, acetate*	Tatlı, çilek, muz, olgun meyve
Ethyl pentanoate*	Meyveli, çilek, tatlı, ananas ve tropikal meyveler
Hexyl acetate*	Meyveli, yeşil, elma, muz, tatlı
Limonene	Turunçgil, portakal, taze, tatlı
Isoamyl isovalerate*	Tatlı, meyveli, muz, çilek
Hexanal Propylene Glycol Acetal	Tatlı, meyveli, mumsu, yeşil, ananas
2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester*	Tatlı çilek, kiraz
Isobutyric acid	Tereyağı; çilek
Benzyl benzoate	Balzemik, meyveli, pudralı nüanslar

*Çilek aromasının literatürde belirtilen aroma aktif bileşenleri

* *Aroma active compounds of strawberry mentioned in the literature*

Nem ve su aktivitesi

Püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen mikrokapsüllerin nem miktarı hızlı nem ölçüm cihazı ile (Kern, DBS- 60, Almanya) belirlenmiştir. Mikrokapsüllerin su aktivitesi (aw) değerleri ise su aktivitesi tayin cihazı (AquaLab, 4TE, ABD) ile oda sıcaklığında ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) ölçülmüştür.

Yığın yoğunluğu

Toz çilek aroması mikrokapsüllerinde yığın yoğunluğu analizi Koç (2015)' e göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla unda 2 g toz örnek 10 mL' lik mezür içerisine tartıldıktan sonra 20 defa sert bir zemine vurularak aralardaki boşlukların kalmayıp sıkıştırılmasından sonraki hacim okunarak sonuçlar kütle/hacim oranından kg/m^3 olarak hesaplanmıştır.

Parçacık boyutu dağılımı

Toz çilek aroması mikrokapsüllerinin parçacık boyut dağılım analizi parçacık boyut ölçüm cihazının sıvı modülü (Malvern, Mastersize 2000, wet dispersion unit, Birleşik Krallık) kullanılarak yapılmıştır. Ölçümlerde propanol kullanılmış olup, sonuçlar $D_{[4,3]}$ [yüzey ağırlıklı ortalama (YAO)], $D_{[3,2]}$ [hacim ağırlıklı ortalama (HAO)], D_{10} , D_{50} ve D_{90} değerleri üzerinden verilmiştir.

Model Gıda Üretimi

Püskürterek kurutma yöntemi ile üretilen çilek aroması mikrokapsülleri üretimlerinin ardından model gıdalara işlenmiş ve ürünlerde duyu analizi gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda model gıda olarak çikolata ve kek seçilmiştir. Bu ürünlerin seçiminde ısıl işlemin uygulandığı (kek) ve uygulanmadığı (çikolata) ürünlerdeki değişimin incelenmesi göz önünde bulundurulmuştur.

Çikolata yapımında piyasadan temin edilen sütlü çikolata kuvertürleri ve şekillendirmede silikon çikolata kalıpları kullanılmıştır. Çilek aromalı çikolata yapımında çikolata kuvertürü kontrollü olarak 40 °C’de benmari usulü eritilmiştir. Çilek aromasının (sıvı aroma/kontrol) ve çilek aroması mikrokapsüllerinin eklenebilmesi ve kristalizasyon işlemi için sıcaklık kontrollü olarak 30 °C’ye azaltılmış ve aroma mikrokapsülleri ile sıvı aroma (kontrol) %0.1 oranında (aroma mikrokapsülü/çikolata) ilave edilerek mutfak tipi robot ile 15 dakika boyunca karıştırılmış ardından hızlı bir şekilde kalıplara dökülmüştür. Kalıplara dökülüp şekillendirilen çikolatalar yaklaşık 15 saat oda sıcaklığında dinlendirildikten sonra duyu analizi gerçekleştirilmiştir.

Aromalı kek üretiminde ise un (%40), şeker (%23), yağ (%20), yumurta (%16) ve kabartma tozu (%1) kullanılarak bir hamur miksi hazırlanmış, hazırlanan miks 2 kısma ayrılarak birincisine %1 oranında ticari sıvı aroma, diğerine ise yine aynı oranda aroma mikrokapsülleri eklenerek homojen dağılması amacıyla karıştırılmıştır. Hazırlanan hamur karışımları 180 °C’de 30 dakika süreyle fırında (Siemens, HB114FBV0T) pişirilerek, soğutulduktan sonra duyu analizi gerçekleştirilmiştir.

Duyusal Analiz

Duyusal analizler Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nde görev yapan yaşları 23-35 arasında değişen 15 panelist (9 Kadın, 6 Erkek) ile yapılmıştır. Panelistlerden örnekleri görünüm, tekstür, koku, tat, hissedilen aromanın şiddeti ve genel beğeni açısından 1-5 arasında puanlandırmaları istenmiş, panel öncesi gıdaların değerlendirilmesinde aranan özellikler hakkında kısa bir bilgilendirme yapılmıştır.

İstatistiksel analiz

Çilek aromasından püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsülasyon işlemi iki tekerrürlü, analizler ise üç paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen verilere varyans analizi uygulanmış ve önemli bulunan farklılıklara ise Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır (Düzgüneş vd., 1987). Tüm istatistiki

hesaplamalar SAS programı (SAS, Cary, NC, USA) ile gerçekleştirilmiş olup değerler ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Depolama süresine bağlı olarak aroma profilinin değişimi

Enkapsülasyon işlemi uygulanmamış sıvı çilek aromasının (kontrol) depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak aroma aktif bileşenlerinin değişimi incelendiğinde (Çizelge 2), depolamanın başlangıcında çilek aromasında oldukça baskın olan “butanoic asit, 2-metil-, etil ester”, “3-hexen-1-ol”, “3-hexen-1-ol, asetat”, “hexyl asetat” ve “2-propenoic asit, 3-phenyl-, metil ester” bileşenlerinin alan değerlerinin her 2 sıcaklık için de depolama süresinin artmasına bağlı olarak özellikle 30. günden itibaren başlangıç miktarlarına göre önemli oranda (> % 90) azaldığı, yukarıdaki bileşenlerin hemen hemen tamamının 60. gün sonunda tespit edilemediği görülmüştür. Depolamanın ilk gününde çileğe özgü başlıca 17 aroma bileşeninin toplam alanı 58182×10^3 iken, depolama süresi sonunda bu alanın 4 °C’de depolanan çilek aromalarında 204×10^3 e; 25 °C’de depolananlarda ise 166×10^3 e azaldığı belirlenmiştir. Bu durum ticari olarak sıvı formda depolanan çilek aromalarının 60 gün sonunda istenen özelliklerini neredeyse kaybettiği şeklinde yorumlanmıştır. Depolama sıcaklığı açısından çilek aroması bileşenlerinin toplam alanının değişimi irdelendiğinde ise; 4 °C’de depolanan çilek aromalarının toplam alanının 30 gün sonunda %93 oranında, 25 °C’de depolanan aromaların ise %96 oranında azaldığı görülmüştür.

Sıvı formdaki aroma bileşenleri ile püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen aroma mikrokapsüllerinin bileşimi (Çizelge 3) karşılaştırıldığında, sıvı formda tespit edilen 2-Hexen-1-ol,(E) ve 3-Hexen-1-ol bileşenlerinin toz mikrokapsüllerde belirlenemediği, enkapsülasyon sonunda ise ticari sıvı kontrol formunda bulunmayan 1-Butanol, 3-metil-,asetat bileşenlerinin mikrokapsüllerde bulunduğu görülmüştür.

Çilek aromasının püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyonu

Çizelge 2. Sıvı formdaki çilek aromasının bileşiminin depolama sıcaklığı ve süresine (gün) bağlı olarak değişimi (alan $\times 10^3$)

Table 2. Change of the composition of strawberry aroma in liquid form depending on storage temperature and time (day) (area $\times 10^3$)

Bileşen Compound	4 °C				25 °C			
	0.	15.	30.	60.	0.	15.	30.	60.
Butanoic asit, 2-metil-, metil ester	1142.68 ^a	1125.36 ^a	50.945 ^b	20.78 ^b	1142.68 ^a	1037.85 ^a	t.e.	21.28 ^b
Butanoic asit., etil ester	7023.70 ^a	405.10 ^b	259.45 ^d	t.e.	7023.70 ^a	341.24 ^c	122.22 ^d	t.e.
Butanoic asit, 2-metil-, etil ester	6403.37 ^a	366.46 ^b	245.96 ^c	59.161 ^d	6403.37 ^a	315.28 ^{b,c}	135.45 ^d	62.65 ^d
Butanoic asit, 3-metil-, etil ester	996.37 ^a	31.67 ^b	46.45 ^b	t.e.	996.37 ^a	38.65 ^b	t.e.	t.e.
3-Hexen-1-ol	3101.02 ^a	1580.88 ^{a,b}	1024.60 ^{a,b}	t.e.	3101.02 ^a	157.10 ^b	t.e.	t.e.
2-Hexen-1-ol, (E)-	1038.89 ^a	975.41 ^b	t.e.	t.e.	1038.89 ^a	929.51 ^b	19.23 ^b	t.e.
1-Hexanol	640.44 ^a	615.35 ^a	14.40 ^b	t.e.	640.44 ^a	602.85 ^a	t.e.	t.e.
Etil pentanoate	274.18 ^a	250.98 ^a	t.e.	t.e.	274.18 ^a	236.78 ^a	t.e.	t.e.
Etil hexanoate	9469.93 ^a	448.93 ^b	512.16 ^c	71.88	9469.93 ^a	8379.10 ^b	374.61 ^c	63.66 ^c
3-Hexen-1-ol, asetat	15514.04 ^a	15075.81 ^b	1006.45 ^d	t.e.	15514.04 ^a	14907.47 ^c	905.674 ^d	t.e.
Hexyl asetat	1143.72 ^a	1065.67 ^a	t.e.	t.e.	1143.72 ^a	967.32 ^a	t.e.	t.e.
2-Hexen-1-ol, asetat	430.51 ^a	427.81 ^a	51.23 ^b	18.16 ^b	430.51 ^a	407.60 ^a	43.57 ^b	19.04 ^b
Isoamyl isovalerate	7596.48 ^a	368.73 ^b	397.67 ^b	34.9 ^b	7596.48 ^a	374.74 ^b	363.34 ^b	t.e.
Butanoic asit, 2-metil-, hexyl ester	14.66 ^a	12.56 ^a	t.e.	t.e.	14.66 ^a	10.79 ^a	t.e.	t.e.
Metil cinnamylate	206.58 ^a	196.27 ^a	192.80 ^a	t.e.	206.58 ^a	172.24 ^a	170.69 ^a	t.e.
2-Propenoic asit, 3-phenyl-, metil ester	4121.08 ^a	3867.44 ^a	t.e.	t.e.	4121.09 ^a	3598.56 ^a	t.e.	t.e.
TOPLAM	58182.67 ^a	34489.29 ^b	4068.29 ^c	204.95 ^d	58182.68 ^a	32477.10 ^b	2193.78 ^{c,d}	166.56 ^d

t.e.: tespit edilemedi. Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade etmektedir ($P<0.01$).

t.e.: not detected. Different letters in same line mean the statistical significance ($P<0.01$).

Çizelge 3. Püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen çilek aroması mikrokapsüllerinin aroma bileşiminin depolama sıcaklığı ve süresine (gün) bağlı olarak değişimi (alan x 10³)
 Table 3. Change of the aroma composition of strawberry aroma microcapsules obtained by spray drying method depending on storage temperature and time (day) (area x 10³)

Bileşen Compound	4 °C				25 °C			
	0.	15.	30.	60.	0.	15.	30.	60.
Butanoic asit, 2-metil, metil ester	337.90 ^b	413.81 ^a	325.46 ^b	43.61 ^c	337.90 ^b	305.88 ^b	100.87 ^{b,c}	t.e.
Butanoic asit, etil ester	1477.67 ^a	1402.46 ^{a,b}	1203.83 ^b	50.20 ^c	1477.67 ^a	1273.35 ^{a,b}	12.36 ^c	7.71 ^c
Butanoic asit, 2-metil-, etil ester	3895.33 ^a	3225.24 ^b	3020.24 ^b	2881.19 ^{b,c}	3895.33 ^a	3002.54 ^b	2359.88 ^{c,d}	2135.76 ^d
Butanoic asit, 3-metil-, etil ester	949.91 ^a	796.37 ^b	601.70 ^c	414.50 ^d	949.91 ^a	736.39 ^b	592.45 ^c	444.51 ^d
1-Hexanol	192.25 ^a	181.18 ^a	t.e.	t.e.	192.25 ^a	t.e.	t.e.	t.e.
1-Butanol, 3-metil-, asetat	231.67 ^a	166.24 ^b	t.e.	t.e.	231.67	t.e.	t.e.	t.e.
Etil pentanoat e	6820.79	t.e.	t.e.	t.e.	6820.79	t.e.	t.e.	t.e.
Etil hexanoate	784.47 ^a	616.09 ^b	580.76 ^b	443.72 ^c	784.47 ^a	580.76 ^b	409.86 ^c	170.43 ^d
3-Hexen-1-ol, asetat	657.99 ^a	514.05 ^b	409.93 ^c	299.66 ^d	657.99 ^a	466.45 ^c	310.23 ^d	186.35 ^e
Hexyl asetat	662.55 ^a	445.27 ^b	234.77 ^c	197.52 ^{c,d}	662.55 ^a	425.90 ^b	210.24 ^c	159.35 ^d
2-Hexen-1-ol, asetat	281.01 ^a	234.77 ^b	26.56 ^c	t.e.	281.01 ^a	11.05 ^c	t.e.	t.e.
Butanoic asit 3-metilbutyl ester	11469.31 ^a	10496.28 ^b	8093.83 ^c	7611.03 ^d	11469.31 ^a	10493.49 ^b	6594.75 ^c	608.45 ^f
Isoamyl isovalerate	16446.17 ^a	16099.86 ^a	15025.01 ^{a,b}	12878.86 ^b	16446.17	16345.17 ^a	14340.26 ^{a,b}	9823.27 ^c
2-Propenoic asit, 3-phenyl-metil ester	6851.81 ^a	5695.11 ^b	451.69 ^d	219.21 ^{d,e}	6851.81 ^a	4001.11 ^c	t.e.	146.36 ^e
TOPLAM	48165.45 ^a	41710.96 ^{a,b}	30312.04 ^{b,c}	25039.48 ^{c,d}	48165.45 ^a	37247.63 ^{a,b,c}	25573.54 ^{c,d}	13582.20 ^d

t.e.: tespit edilemedi. Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade etmektedir ($P<0.01$).

t.e.: not detected. Different letters in same line mean the statistical significance ($P<0.01$)

Çizelge 3 incelendiğinde çilek aromasında etkili rol oynayan aroma aktif bileşenlerinin toplam alanının depolamanın başlangıcında 48165.45x10³ olduğu, depolamanın sonunda 4°C’ de depolanan örneklerde bu alanın 25039.48 x10³ e; 25°C’ de

depolanan örneklerde ise 13582.20 x10³ e düştüğü belirlenmiştir. Çilek aromasında yüksek oranda bulunan esterlerin depolama süresince alanları incelendiğinde ise 30. güne kadar alanın çok değişmediği ancak 60. günde istatistiksel

olarak önemli seviyede ($P<0.01$) azalış gösterdiği görülmektedir. Benzer şekilde çilek aromasında yüksek alana sahip ve ayrıca çilek aromasına meyveli, çileğimsi aromada katkı sağlayan isoamyl isovalerate bileşeninin de 30. güne kadar istatistiksel açıdan önemli seviyede ($P>0.05$) değişmediği, 60. gün sonunda %21 oranında azaldığı belirlenmiştir. Bu azalış ticari formda depolanan çilek aromasında ise depolama sonunda %94 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen çilek mikrokapsüllerinin aroma aktif bileşeni açısından depolama stabilitesinin ticari formuna göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Aroma mikrokapsüllerinin farklı sıcaklıklardaki aroma bileşenleri açısından depolama stabilitesi incelendiğinde ise depolama sıcaklığının aroma maddelerinin korunumu açısından oldukça önemli olduğu; toplam alanın 4 °C' de depolanan örneklerde 60 gün sonunda %48 oranında azaldığı, 25 °C' de depolanan örneklerde ise bu oranın %72 olduğu belirlenmiştir. Püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen çilek aroması mikrokapsüllerinde belirlenen aroma bileşenlerinin depolama süresine bağlı olarak salınımlarının birbirlerinden farklı oldukları görülmüş olup bu durum bileşenlerin molekül ağırlıklarının farklı olması ile ilişkilendirilmektedir (Jafari vd., 2008). Voiley vd. (1995) tarafından arabik gam kullanılarak etil hexonate ve etil butyrate bileşenlerinin püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsüle edildiği çalışma sonucunda molekül ağırlığı daha yüksek olan etil hexonate' in etil butyrate' a göre depolama süresine bağlı olarak daha iyi korunduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar bu farklılığı molekül ağırlığının artması ile difüzyonun yavaşlaması ile açıklamışlardır. Çalışma kapsamında da çilek mikrokapsüllerinde bulunan etil hexonate' in alanı depolama başlangıcında 784.47×10^3 olarak belirlenirken, depolama sonunda bu alan 443.72×10^3 olarak tespit edilmiştir. Mikrokapsüllerde belirlenen butanoic asit, etil ester bileşenin alanı ise 1477.67×10^3 'den 50.22×10^3 e azalmıştır. Pellicer vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada çilek aroması farklı taşıyıcı materyaller ile (MD, HiCap, β -SD, AG) 180 °C hava girişi sıcaklığında püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsüle edilmiş olup, MD-HiCap- β -SD karışımından oluşan taşıyıcı

materyal ile kurutulan örneklerin aroma maddelerini daha iyi koruduğu, kurutma sonrası etil acetoasetat oranının %20.7' den %13.4' e, benzyl alcohol bileşeninin %73' ten %47.8' e ve etil 2-asetat bileşeninin %84.5' ten %28.1' e düştüğü bildirilmiştir.

Mikrokapsüllerin depolama şartlarına bağlı olarak nem ve su aktivitesi değişimi

Toz ürünlerin nem içeriği ve su aktivitesi değerleri depolama stabilitesi açısından önem taşımakta olup, 0.65 altındaki su aktivitesi değerleri mikrobiyal açıdan güvenilir olsa da, kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar açısından 0.2-0.3 arasındaki su aktivitesi değerlerinin güvenilir aralık olduğu belirtilmektedir (Acar ve Cemeroglu, 1999). Depolama başlangıcında %3.36 olan toz mikrokapsüllerin nem miktarı değerleri, 60 günlük depolama süresi sonunda 4 °C' de depolanan örnekler için %4.43; 25 °C' de depolanan örnekler için ise %4.39 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4). Benzer şekilde örneklerin su aktivitesi değerleri de depolama süresine bağlı olarak istatistiksel açıdan önemli derecede ($P<0.01$) artış göstermiştir. Depolama süresi sonunda toz mikrokapsüllerin su aktivitesi değerleri 4 ve 25 °C' de depolanan örnekler için sırasıyla 0.37 ve 0.39 olarak belirlenmiş olup (depolama başlangıcında bu değerler sırasıyla 0.14 ve 0.18' dir), bu değerlerin kimyasal-biyokimyasal açıdan güvenli aralığın dışında olduğunu söylenebilir.

Mikrokapsüllerin depolamaya bağlı olarak yığın yoğunluğu değişimi

Yığın yoğunluğu toz ürünler için önemli parametrelerden biri olup, gıdaların akış özelliklerini, depolama stabilitesini ve ambalaj hacmini etkilemektedir. Sonuçlar incelendiğinde her iki depolama sıcaklığı için de depolama süresine bağlı olarak örneklerin yığın yoğunluğu değerlerinin istatistiki açıdan önemli derecede ($P>0.05$) olmasa da azaldığı görülmektedir (Çizelge 4). Bu azalışın ürünlerin nem miktarındaki artış ile ilişkilendirilmesi mümkündür. Literatürde toz ürünlerin depolama süresi ile birlikte kitle yoğunluklarının arttığı bildirildiği bazı çalışmalar (Samborska vd., 2015; Muzaffar ve Kumar, 2016) olsa da; Chang vd. (1998) toz gıdaların su aktivitesi değerinin

artmasıyla kitle yoğunluğu değerlerinin arttığı belirtilmiş ve bu artışın sıvı köprüler ile toz partiküllerin arasındaki boşlukların azalmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Mikrokapsüllerin depolamaya bağlı olarak parçacık boyutu dağılımının değişimi

Toz mikrokapsüllerin boyutlarının değişimi gıdaların dokusunu ve duyuşal özelliklerini etkilediğinden dolayı gıda endüstrisinde ürünlere işlenen kapsüllenmiş bileşenlerin gıdanın dokusunu, duyuşal özelliklerini, rengini veya tadını etkilememesi arzu edilmektedir. Çalışma kapsamında püskürterek kurutma yöntemi ile toz forma dönüştürülen ve farklı sıcaklıklarda depolanan aroma kapsüllerinin parçacık boyutu

dağılımı depolama süresince ölçülerek depolama şartlarının kapsüllerin boyutu üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Toz ürünlerin $D_{[4.3]}$ [hacim ağırlıklı ortalama (HAO)], $D_{[3.2]}$ [yüzey ağırlıklı ortalama (YAO)], D_{10} , D_{50} ve D_{90} değerleri Çizelge 5'te, parçacık boyutu dağılımları ise Şekil 1' de verilmiştir. Sonuçlarda ifade edilen $D_{[4.3]}$ değeri genellikle parçacık sayısının önemsiz olduğu durumlarda kullanılmakta iken, aktif yüzeylere sahip parçacıklarda veya yüzey alanının önemli olduğu durumlarda $D_{[3.2]}$ değeri kullanılmaktadır. Ayrıca parçacık büyüklüğünü ifade etmek için kullanılan D_{10} , D_{50} ve D_{90} değerleri sırasıyla mikrokapsül çaplarının %10' unun, %50' sinin ve %90' ının belirtilen değere eşit ya da bu değerlerin altında bir değer olduğunu belirtmektedir.

Çizelge 4. Püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilmiş çilek mikrokapsüllerinin depolamaya bağlı nem ve su aktivitesi değişimi

Table 4. Change of moisture content, water activity, and bulk density of strawberry microcapsules obtained by spray-drying method

Sıcaklık <i>Temperature</i>	Süre (gün) <i>Time (day)</i>	Nem miktarı (%) <i>Moisture content (%)</i>	Su aktivitesi <i>Water activity</i>	Yığın yoğunluğu (kg/m ³) <i>Bulk density (kg/m³)</i>
4°C	0.	3.36 ^c ±0.21	0.14 ^c ±0.01	351.60±1.76
	15.	4.02 ^b ±0.06	0.22 ^{bc} ±0.06	350.44±5.60
	30.	4.21 ^{ab} ±0.26	0.29 ^{ab} ±0.07	348.77±1.39
	60.	4.43 ^a ±0.28	0.37 ^a ±0.03	347.59±2.93
25°C	0.	3.36 ^b ±0.21	0.18 ^b ±0.01	351.60±1.76
	15.	3.78 ^b ±0.18	0.27 ^{ab} ±0.03	350.83±11.27
	30.	4.07 ^{ab} ±0.05	0.34 ^a ±0.00	348.82±0.38
	60.	4.39 ^a ±0.24	0.39 ^a ±0.00	344.57±1.13

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade etmektedir ($P<0.01$)

Different letters in same column mean the statistical significance ($P<0.01$).

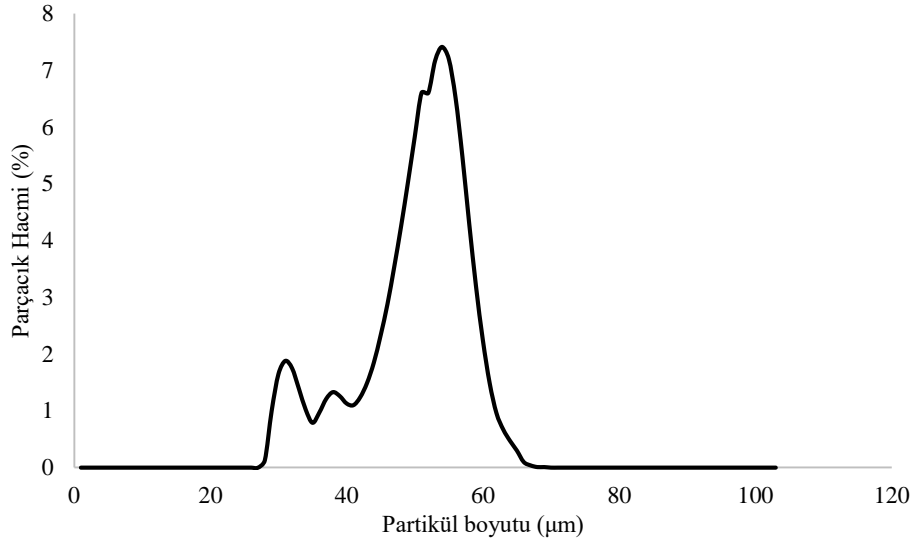
Çizelge 5. Çilek mikrokapsüllerinin depolamaya bağlı parçacık boyutu değişimi (µm)

Table 5. Change of particle size of strawberry microcapsules during storage (µm)

	D_{10}	D_{50}	D_{90}	$D_{[3.2]}$	$D_{[4.3]}$	
4°C	0.	1.17 ^a ±0.01	10.14 ^b ±0.47	22.91 ^c ±0.06	3.61 ^c ±0.01	12.86 ^b ±0.10
	15	1.32 ^a ±0.21	10.35 ^b ±0.01	25.82 ^b ±0.19	4.60 ^a ±0.02	11.83 ^b ±0.01
	30.	1.89 ^b ±0.01	10.42 ^b ±0.14	26.07 ^b ±0.14	4.60 ^a ±0.01	12.76 ^b ±0.03
	60.	1.99 ^b ±0.17	11.77 ^a ±0.07	28.28 ^a ±0.65	4.12 ^b ±0.26	15.02 ^a ±0.88
25°C	0.	1.17 ^b ±0.01	10.14 ^c ±0.47	22.91 ^c ±0.06	3.61 ^c ±0.01	12.86 ^b ±0.10
	15.	2.16 ^a ±0.11	11.16 ^b ±0.03	27.29 ^b ±0.58	3.83 ^c ±0.04	14.84 ^a ±0.16
	30.	2.14 ^a ±0.04	12.30 ^b ±0.04	27.42 ^b ±0.23	4.79 ^b ±0.05	14.03 ^b ±0.22
	60.	2.35 ^a ±0.17	12.93 ^a ±0.02	27.87 ^a ±0.56	5.11 ^a ±0.03	14.57 ^{ab} ±0.24

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade etmektedir ($P<0.01$)

Different letters in same column mean the statistical significance ($P<0.01$).



Şekil 1. Püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen çilek aroması kapsüllerinin parçacık boyutu dağılımı

Figure 1. Particle size distribution of strawberry aroma microcapsules obtained by spray drying method

Toz mikrokapsüllerin depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak D_{10} değerlerinin 1.17-2.35 μm , D_{50} değerlerinin 10.14-12.93 μm , D_{90} değerlerinin 22.91-28.28 μm , $D_{[3,2]}$ değerlerinin 3.61-5.11 μm ve $D_{[4,3]}$ değerlerinin ise 11.83-15.02 μm arasında değiştiği belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde çilek aroması mikrokapsüllerinin başlangıç D_{50} değerinin 10.14 μm olduğu ve depolama süresi sonunda bu değerinin 4 $^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan örneklerde 11.77 μm 'ye ve 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan örneklerde ise 12.93 μm 'ye yükseldiği görülmektedir. Depolama süresi ve sıcaklığının artması ile çilek aroması mikrokapsüllerinin parçacık boyutundaki artış nem absorpsiyonuna bağlı gerçekleşen ve toplanma olarak bilinen, partiküllerin birbirine yapışması ile ilişkilendirilmiştir. Partikül boyutunun depolama koşullarından etkilenebileceği, artan sıcaklıkla birlikte, depolanan materyalin özelliğine bağlı olarak partikül boyutunun azalabileceği ya da artabileceği rapor edilmiştir (Koç vd., 2015). Çalışma sonuçlarına paralel olarak limonen aromasının arabik gam kullanılarak püskürterek kurutma yöntemi ile mikrokapsülasyonunun araştırıldığı bir çalışmada örneklerin D_{50} değerinin depolama süresi sonunda 15.7 μm 'den 23.2 μm 'e yükseldiği bildirilmiştir (Bertolini vd., 2001).

Duyusal analiz sonuçları

Aroma maddeleri gıda endüstrisinde pastacılık ürünleri, içecekler, süt ürünleri, atıştırmalık çerezler, çikolatalar, şekerlemeler ve sakızlar gibi birçok üründe kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında toz forma getirilmiş çilek aromasının beğeni durumunun ortaya koyulabilmesi amacıyla mikrokapsüller hazırlanan çikolatalaya ve keke ilave edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde kapsüllenen çilek aroması ile üretilen çikolatalarda test edilen duyu özelliklerinin panelistler tarafından daha çok beğenildiği (Şekil 2), özellikle de aroma şiddeti, koku, tat ve genel beğeni açısından kapsüllenen örneklerin istatistiksel olarak da önemli derecede ($P < 0.01$) daha yüksek puan aldığı görülmektedir (Çizelge 6).

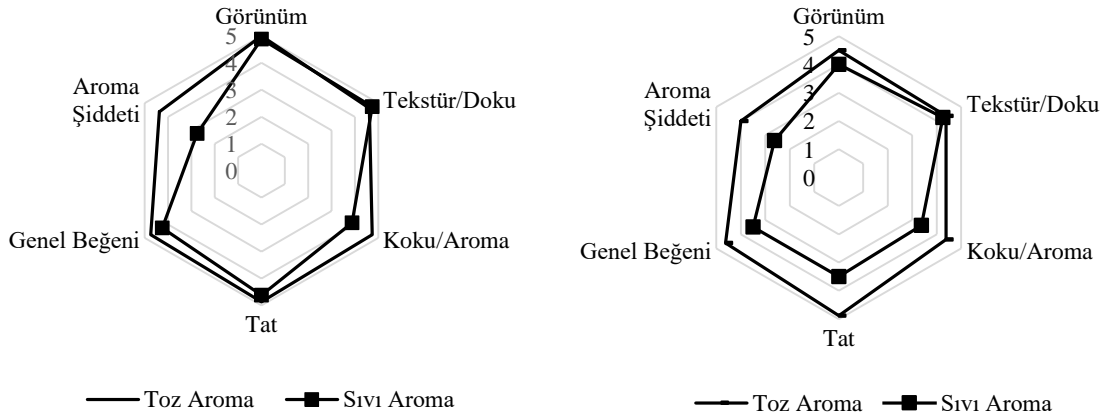
Çilek aroması kullanılarak üretilen keklerin duyu analiz verilerine bakıldığında da benzer şekilde koku, aroma şiddeti ve genel beğeni sonuçlarında püskürterek kurutma yöntemi ile kapsüllenen çilek aroması kullanılarak üretilen keklerin, ticari sıvı formda üretilen keklere göre daha yüksek puan aldığı ($P < 0.01$) görülmektedir. Bu sonuçlar enkapsülasyon işlemi ile üretim sırasındaki koşullara karşı daha stabil çilek aromasının elde edilebildiğini göstermiştir.

Çizelge 6. Çilek aromalı çikolata ve keklere ait duyu analizi sonuçları
 Table 6. Sensory analysis results of chocolate and cakes flavored by strawberry aroma

Çikolata	Görünüm	Tekstür	Koku	Tat	Aroma şiddeti	Genel beğeni
<i>Chocolate</i>	<i>Appearance</i>	<i>Texture</i>	<i>Odor</i>	<i>Taste</i>	<i>Aroma intensity</i>	<i>General taste</i>
Ticari-Sıvı <i>Commercial-Liquid</i>	4.88±0.12	4.75±0.25	3.88 ^b ±0.29	4.63±0.18	2.75 ^b ±0.31	4.25 ^b ±0.25
Toz-Kapsül <i>Powder-Capsule</i>	5.00±0.00	4.63±0.26	4.75 ^a ±0.16	4.88 ^a ±0.12	4.38 ^a ±0.26	4.75 ^a ±0.16
Kek <i>Cake</i>						
Ticari-Sıvı <i>Commercial-Liquid</i>	4.00±0.19	4.25±0.25	3.38 ^b ±0.26	3.50 ^b ±0.76	2.63 ^b ±0.32	3.50 ^b ±0.19
Toz-Kapsül <i>Powder-Capsule</i>	4.50±0.19	4.38±0.18	4.38 ^a ±0.26	4.88 ^a ±0.35	4.00 ^a ±0.38	4.63 ^a ±0.18

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel farkı ifade etmektedir ($P<0.01$)

.Different letters in same column mean the statistical significance ($P<0.01$).



a

b

Şekil 2. Çilek aromalı çikolata (a) ve keklere (b) ait duyu analizi sonuçları
 Figure 2. Sensory analysis results of chocolate (a) and cakes (b) flavored by strawberry aroma

SONUÇ

Ekonomik değeri oldukça yüksek olan aroma maddelerinin depolama stabiliteğini arttırmak ve işlenmeleri sırasındaki salınımlarının kontrolünü sağlamak oldukça önemlidir. Son yıllarda, gıda endüstrisinde oksijen, nem, sıcaklık, ışık ve benzeri çevre koşullarına karşı koruma sağlayan ve aktif bileşenin doğru yerde, doğru zamanda kontrollü salınımlarına olanak veren enkapsülasyon uygulamaları gittikçe yaygınlaşmaktadır. Nitekim

bu çalışma ile sıvı formdaki çilek aromasının püskürtülerek kurutma yöntemi ile başarılı bir şekilde enkapsüle edilebileceği ve bu yöntemle elde edilen mikrokapsüllerin depolama kararlılığının arttırabileceği görülmüştür. Çalışma sonuçları sıvı formda toplam aroma bileşenlerinde 60 günlük depolama süresi sonunda %95'den fazla oranda kaybın meydana geldiğini, bu kaybın enkapsülasyon işlemiyle 4 °C de depolanan örneklerde yarı yarıya azaltılabildiğini göstermiştir.

Depolama sıcaklığının artması ile birlikte aroma salınımının da arttığı görülmüştür. Toz mikrokapsüllerin depolama süresince nem absorbe ettikleri, buna bağlı olarak su aktivitesi değerlerinin arttığı ve özellikle 60 günlük depolama süresi sonunda kimyasal reaksiyonlar açısından su aktivitesi değerlerinin kritik bir noktaya geldikleri tespit edilmiştir. Nem absorpsiyonuna bağlı olarak tozların depolama süresi ile birlikte partikül boyutlarının arttığı ve kitle yoğunluklarının ise azaldığı görülmüştür. Bu anlamda elde edilen sonuçlar, aroma maddelerinin iyi bir şekilde ambalajlanarak depolanması gerektiğini göstermiştir. Çilek aroması mikrokapsülleri ile üretilen çikolata ve kek duyuşal açıdan ticari forma göre üretilen ürünlere göre daha fazla beğenilmiş olup, özellikle aroma şiddetinin enkapsüle edilen aromalarla üretilen gıdalarda daha fazla hissedildiği görülmüştür. Bu sonuç aroma enkapsülasyonu ile gıdaların işlenmesi sırasında kararlılık sağlanabileceğini de göstermiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Bu makalede yer alan yazarların arasında herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan ederiz.

YAZARLARIN KATKISI

Ferhan BALCI TORUN, analizlerinin yapılması, sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi aşamalarında ve makalenin yazım sürecinde; Feramuz ÖZDEMİR, çalışma planının kurulması, çalışmanın yürütülmesi ve makalenin yazım sürecinde katkıda bulunmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (FDK-2015-768) ve aromaların teminindeki desteklerinden dolayı Aromsa Besin Aroma ve Katkı Maddeleri Sanayi Ticaret A.Ş.'ye teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Acar, J., B. Cemeroglu. (1999). *Meyve ve sebze teknolojisi*. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları Yayın: 43,399.

Anonim (2013). www.tarim.gov.tr

Balcı-Torun, F., (2019). Farklı enkapsülasyon yöntemleri kullanılarak elde edilen aroma kapsüllerinin depolama stabilitesinin ve gıda katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Antalya, Türkiye, 182 s.

Balcı-Torun, F., Özdemir, F., (2021). Encapsulation of strawberry flavour and physicochemical characterization of the encapsulated powders. *Powder Tech*, 380, 602-612.

Bertolini, A., Siani, A., Grosso, C. (2001). Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.*, 49(2): 780-785.

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

Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.

Chang, K.S., Kim, D.W., Kim, S.S., Jung, M.Y. (1998). Bulk flow properties of model food powder at different water activity. *International Journal of Food Properties*, 1(1): 45-55.

Düzgüneş, O., et al. "Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik Metotları-II), Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 1021." Ders kitabı 295 (1987).

Forney, C.F., Kalt, W., Jordan M.A. (2000). The Composition of Strawberry Aroma Is Influenced by Cultivar, Maturity, and Storage. *Hortscience*, 35:6, 1022-1026.

Galmarini, M.V., Baren, C., Zamora, M.C., Chirife, J., Lira, P., L., Bandoni, A. (2011). Impact of trehalose, sucrose and /or maltodextrin addition on aroma retention in freeze dried strawberry puree. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 1337-1345

Gibbs F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C.N. (1999). "Encapsulation in the food industry: a review." *Int J Food Sci Nutr*, 50:3: 213-224.

Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B. (2008). Encapsulation efficiency of food flavours

- and oils during spray drying. *Drying Technol.*, 26(7): 816-835.
- Jetti, R.R., Yang, E., Kurnianta, A., Finn, C., Qian, M.C., (2007). Quantification of selected aroma-active compounds in strawberries by headspace solid-phase microextraction gas chromatography and correlation with sensory descriptive analysis. *Journal of Food Science* 72.
- Jimenez, M., Garcia, H.S, Beristain, C.I. (2004). Spray-drying microencapsulation and oxidative stability of conjugated linoleic acid, *European Food Research and Technology*, 219: 588-592.
- Karaoglu, M., Kotancılar, H., Çelik, İ. (1998). Modifiye nişasta eldesi ve fırın ürünlerinde kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Dergisi*, 29(2): 359-368.
- Kargel, B. C. W. (2000). Effect of polymeric phase transitions on the controlled release and oxidative stability of flavor model systems encapsulated in traditional carbohydrate carriers. Ph.D. Thesis, Faculty of the Graduate School, University of Minnesota, USA.
- Koç, M. (2015). Farklı kurutma yöntemleri ile bal tozu üretim koşullarının optimize edilmesi ve depolama stabilitesinin belirlenmesi. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 202 s.
- Koç, M., Güngör, Ö., Zungur, A., Yalçın, B., Selek, İ., Ertekin, F.K., Ötles, S. (2015). Microencapsulation of extra virgin olive oil by spray drying: effect of wall materials composition, process conditions, and emulsification method. *Food Bioproc Technol*, 8 (2):301-318.
- Koç, M., Sakin, M., Ertekin, F. (2010). Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16: 77-86.
- Krishnan, S., Bhosale, R., Singhal, R.S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin: evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials, *Carbohydrate Polymers*, 61: 95-102
- Madene A., Jacquot M, Scher J., Desorby S. (2006) Flavour encapsulation and controlled release-a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 1, 1-21.
- Mahdavi, S.A., Jafari, S.M., Assadpoor, E., Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum arabic and gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 85: 379-385.
- Muzaffar, K., Kumar, P. (2016). Moisture sorption isotherms and storage study of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technol*, 291: 322-327.
- Pelayo, C., Ebeler, S. E., A. A. Kader. (2003) "Postharvest life and flavor quality of three strawberry cultivars kept at 5 C in air or air+ 20 kPa CO₂." *Postharvest Biology and Technology* 27,2: 171-183.
- Pellicer, J.A., Fortea, M.I., Trabal, J., Rodríguez-López, M.I., Gabaldón, J.A., Núñez-Delgado, E. (2019). Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed. *Powder Technol.*, 347: 179-185.
- Pizzoni, D., Compagnone, D., Di Natale, C., D'Alessandro, N., Pittia, P. (2015). Evaluation of aroma release of gummy candies added with strawberry flavours by gas-chromatography/mass-spectrometry and gas sensors arrays. *Journal of Food Engineering*, 167, 77-86.
- Quek, S.Y., Chok, N. K., Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing*, 46: 386-392.
- Re, M.I. (1998). Microencapsulation by spray drying, *Drying Technology*, 16: 1195-1236.
- Rodriguez-Huezo, M.E., Pedroza-Islas, R., Prado-Barragan, L.A., Beristain, C.I., Vernon-Carter, E.J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids, *Journal of Food Science*, 69: 351-359.
- Samborska, K., Langa, E., Bakier, S. (2015). Changes in the physical properties of honey powder during storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 1359-1365.

Schieberle, P., Hofmann, T., (1997). Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(1), 227-232.

Torun, M., Özdemir, F. (2011). Lezzet artırıcı gıda katkı maddesi: Monosodyum Glutamat (MSG). *Turkchem*, 21: 40-42.

Voilley, A.J. (1995). Flavor encapsulation: Influence of encapsulation media on aroma retention during drying. Chapter 15, pp 169-179.

Zabetakis, I. (1997). Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant cell, tissue and organ culture*, 50(3), 179-183.

Zabetakis, I., Holden, M. A. (1997). Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(4), 421-434.

Zeller, B.L., Saleeb, F.Z., Ludescher, R.D. 1999. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation, *Trends in Food Science and Technology*, 9: 389-394.

Zhu, G.Y., Xiao, Z.B., Zhou, R.J., and Yi, F. P. (2012). Fragrance and flavor microencapsulation technology. In *Advanced Materials Research* (Vol. 535, pp. 440-445). Trans Tech Publications Ltd.

Zuidam, N. J., and Heinrich, E. (2010). Encapsulation of aroma. In *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing* (pp. 127-160). Springer, New York, NY.

İçindekiler / Content

Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Kavaz Yüksel, A., Yüksel, M. *Determination of certain microbiological parameters on cheese samples collected from supermarkets in Erzurum* / Erzurum'da süpermarketlerden toplanan peynir örneklerinde belirli mikrobiyolojik parametrelerin belirlenmesi.....489-499
- Ansoy, Z., Öner, Z. *Determination of the factors that cause bitterness during shelf-life in white cheese produced using ultrafiltered milk* / UF beyaz peynirde raf ömrü boyunca acılaşımaya neden olan faktörlerin belirlenmesi.....552-565
- Demir, T., Andıç, S. *Comparison of some properties of butter oil produced from cultured and uncultured butter at different temperatures* / Kültürlü ve kültürsüz tereyağlarından farklı sıcaklıklarda üretilen sadeyağların bazı özelliklerinin karşılaştırılması.....621-633
- Barut Gök, S. *Effect of UV-C treatment on microbial population and bioactive compounds of orange juice using modified reactor based on dean vortex flow* / Dean girdabı akışına dayalı reaktör tasarımı ile UV-C uygulamasının portakal suyunun mikrobiyal yükü ve biyoaktif bileşenlerine etkisi.....634-646
- Aydin, E. *Attributes of total phenolic content, antioxidant capacity and in-vitro simulated bioaccessibility of astringent, non-astringent and wild (rootstock) persimmons* / Buruk, buruk olmayan ve yabani (anaç) hurmaların toplam fenolik bileşen, antioksidant kapasite ve in-vitro simule edilmiş biyoelenebilirlik özellikleri.....669-680
- Duran, A. *The effect of bovine lactoferrin on the microbiological properties of raw milk* / Sığır laktoferrinin çiğ sütün mikrobiyolojik özelliklerine etkisi681-691
- Guliyeva, F., Sadettin, S. *Assessment of physicochemical and sensory quality of beef patties formulated with pennyroyal (Mentha pulegium L.) powder* / Yarpuz (Mentha pulegium L.) tozu ile formüle edilen sığır köftelerinin fizikokimyasal ve duyu kalitesinin değerlendirilmesi 739-750

Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Yerli, G. A., Özden Tuncer, B. *Koagülaz-negatif Staphylococcus (KNS) ve Macrococcus caseolyticus suşlarının biyofilm oluşturma özelliklerinin ve adezyon faktörlerinin araştırılması* / Investigation of biofilm formation properties and adhesion factors of coagulase-negative Staphylococcus and Macrococcus caseolyticus strains.....500-514
- Dağdelen, A., Akman, N., Çağal, M. M. *GDO analizlerinde kullanılan CRM izolatlarının kontrollü muhafaza koşullarında tekrar kullanım olanaklarının araştırılması* / Investigation of reuse capabilities of CRM isolates used in GMO analysis in the controlled storage conditions515-527
- Rayman Ergün, A., Tekgül, Y. *Farklı karbonhidrat formülasyonları ile üretilmiş ayva suyu konsantresi katkılı sert şekerlerin kalite özelliklerinin incelenmesi* / Investigating the quality characteristics of quince juice concentrate fortified hard candies produced with different carbohydrate formulations.....528-538
- Akbalık, S., Oral, R. A., Dağdelen, A. F., Alkin, E., Uğur, N., Davarcı, B., Karataş, A. B. *Sağlam, M. Havuç cipsinde ideal üretim parametrelerinin belirlenmesi* / Determination of optimum production parameters in carrot chips539-551
- Yücel Şengün, İ., Yücel, E., Kılıç, G., Öztürk, B. *Kabak ve kayısı çekirdeği yağlarının yağ asidi kompozisyonu, biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi* / Determination of fatty acid composition and bioactive properties of pumpkin seed and apricot kernel oils608-620
- Diñer, C., Çınar, A., Elmasulu, S. *Farklı mikrodalgı güç seviyelerinde ve farklı fırın sıcaklıklarında kurutulan hibiskus çanak yapraklarının kuruma karakteristiklerinin ve bazı fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi* / Determination of drying characteristics and some physicochemical characteristics of hibiscus calyx dried at different microwave power levels and different oven temperatures.....647-659
- Kısa, Ç., Tuncer, Y. *Kanatlı etlerinde Staphylococcus aureus yaygınlığı ve antibiyotik direnç profillerinin, antibiyotik direnç ve enterotoksin genlerinin belirlenmesi* / Determination of Staphylococcus aureus prevalence and antibiotic resistance profiles, antibiotic resistance and enterotoxin genes in poultry meats ... 692-706
- Yörük, N. G. *Kantitatif mikrobiyolojik analizlerde ölçüm belirsizliği hesaplanmasında farklı yaklaşımların karşılaştırılması* / Comparison of various approaches in calculation of measurement uncertainty in quantitative microbiological analysis 707-725
- Turan, S., Atalay, D., Solak, R., Özogul, M., Demirtaş, M. *Ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin kuşburnu (Rosa canina L.) meyvesinin toplam fenolik ve karotenoid miktarları ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi* / Effects of ultrasound-assisted extraction parameters on the total phenolic and carotenoid contents and antioxidant activity of rosehip (Rosa canina L.)726-738
- Balcı-Torun, F., Özdemir, F. *Çilek aromasının depolama kararlılığı üzerine püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyon işleminin etkisi ve mikrokapsüllerin model gıdalarda etkinliğinin belirlenmesi* / Influence of the spray-drying encapsulation on the storage stability of strawberry aroma and efficiency of microcapsules in model foods751-765

Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

- Cerit, Z. G., Baloğlu, M. C., Yılmaz, R. *Beyaz peynir mikrobiyotasında kültüromik ve shotgun metagenomik teknolojilerin değerlendirilmesi* / Evaluation of culturomics and shotgun metagenomic technologies in white cheese microbiota.....566-582
- Özdemir, E. E., Görgüç, A., Gençdağ, E., Yılmaz, F. M. *Püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemlerinin temelleri ve bu yöntemler ile gıda atıklarından toz ürünlerin üretimi* / Principles of spray drying and freeze drying techniques and their use in powder production from food wastes.....583-607
- Başar, C. S., Heperkan, Z. D. *Sütün mikrobiyotası ve bozulmasına yol açan önemli bakteriler* / Milk microbiota and its important spoilage bacteria.....660-668