

ISSN Online 2148-015X

ACADEMIC FOOD JOURNAL

AKADEMİK

**GIDA**



Gıda Bilimi ve Teknolojisi Dergisi

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/akademik-gida> Cilt/Volume: 20 Sayı/Number: 2 Nisan - Haziran 2022

**ACADEMIC FOOD JOURNAL**  
A JOURNAL ON FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

**SİDAS MEDYA**

**AKADEMİK GIDA®**  
*ACADEMIC FOOD JOURNAL*

---

**Akademik Gıda®** dergisi Gıda Bilimi ve Teknolojisi alanında hazırlanmış özgün araştırma ve derleme makalelerin yayınlandığı hakemli bir dergidir. Araştırma Notu ve Editöre Mektup gibi yazılar da yayın için değerlendirilmektedir. Dergi 3 ayda bir basılmakta olup 4 sayıda bir cilt tamamlanmaktadır. Dergide Türkçe veya İngilizce olarak hazırlanmış makaleler yayınlanmaktadır.

---

**Baş Editör / Editor-in-Chief**

[Oğuz Gürsoy](#)

(Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur, Türkiye)  
(*Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Food Engineering Department, Burdur, Turkey*)



ogursoy@yahoo.com

---

**Yardımcı Editörler / Associate Editors**

[Özer Kinik](#)

(Ege Üniversitesi, Süt Teknolojisi Bölümü, İzmir, Türkiye)  
(*Ege University, Department of Dairy Technology, Izmir, Turkey*)



ozer.kinik@ege.edu.tr

[Ramazan Gökçe](#)

(Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli, Türkiye)  
(*Pamukkale University, Food Engineering Department, Denizli, Turkey*)



rgokce@pau.edu.tr

[Yusuf Yılmaz](#)

(Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur, Türkiye)  
(*Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Food Engineering Department, Burdur, Turkey*)



yusuf.yilmaz@mehmetakif.edu.tr

---

**Teknik Editör / Technical Editor**

[Hande Özge Güler Dal](#)

(Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Burdur, Türkiye)  
(*Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Food Engineering Department, Burdur, Turkey*)



handeguler@mehmetakif.edu.tr

---

**Uluslararası Yayın Kurulu / International Editorial Board**

**Gıda Mühendisliği / Food Engineering**

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Cynthia Ditchfield</a>	University of Sao Paolo, Faculty of Animal Science and Food Engineering, Department of Food Engineering	Sao Paolo	Brazil
<a href="#">Arif Hepbaşlı</a>	Yaşar University, Department of Energy Systems Engineering	İzmir	Turkey
<a href="#">Filiz İçier</a>	Ege University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	İzmir	Turkey
<a href="#">Erkan Karacabey</a>	Süleyman Demirel University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Isparta	Turkey
<a href="#">Sami Gökhan Özkal</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Denizli	Turkey
<a href="#">Konstantinos Petrotos</a>	Technological Educational Institute of Larissa, Department of Agricultural Engineering Technologists	Larissa	Greece
<a href="#">Jenny Ruales</a>	Escuela Politécnica Nacional, Departamento de Ciencias de Alimentos y Biotecnología	Quit	Ecuador
<a href="#">Yahya Tülek</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Denizli	Turkey

**Gıda Kimyası / Food Chemistry**

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Fahrettin Göküş</a>	Gaziantep University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Gaziantep	Turkey
<a href="#">Piotr Koczon</a>	Warsaw University of Life Sciences, Faculty of Food Sciences, Department of Chemistry	Warsaw	Poland
<a href="#">Erdoğan Küçüköner</a>	Süleyman Demirel University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Isparta	Turkey
<a href="#">Semih Ötles</a>	Ege University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	İzmir	Turkey
<a href="#">Beraat Özçelik</a>	Istanbul Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Food Engineering Department	İstanbul	Turkey
<a href="#">Osman Sağdıç</a>	Yıldız Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Food Engineering Department	İstanbul	Turkey
<a href="#">Romeo Toledo</a>	Emeritus Professor, University of Georgia, Department of Food Science and Technology	Georgia	USA

**Gıda Mikrobiyolojisi & Biyoteknoloji / Food Microbiology & Biotechnology**

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Iuliana Aprodu</a>	Dunarea de Jos University of Galati, Department of Food Science, Food Engineering and Applied Biotechnology,	Galati	Romania
<a href="#">Muhammet Arıcı</a>	Yıldız Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Food Engineering Department	İstanbul	Turkey
<a href="#">Jurislav Babic</a>	University of Osijek, Faculty of Food Technology	Osijek	Croatia
<a href="#">Oana Emilia Constantin</a>	Dunarea de Jos University of Galati, Department of Food Science, Food Engineering and Applied Biotechnology,	Galati	Romania
<a href="#">İbrahim Çakır</a>	Abant İzzet Baysal University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Bolu	Turkey
<a href="#">Ahmet Hilmi Çon</a>	Ondokuz Mayıs University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Samsun	Turkey
<a href="#">Mehmet Yekta Gökşungur</a>	Ege University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	İzmir	Turkey
<a href="#">Şebnem Harsa</a>	İzmir Institute of Technology, Food Engineering Department	İzmir	Turkey
<a href="#">Patricia Munsch-Alatossava</a>	Independent Researcher	Helsinki	Finland
<a href="#">Ömer Şimşek</a>	Yıldız Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Food Engineering Department	İstanbul	Turkey
<a href="#">Özgür Tarhan</a>	Uşak University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Uşak	Turkey

## Gıda Analizleri / Food Analysis

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Abdullah Akdoğan</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Chemical Engineering Department	Denizli	Turkey
<a href="#">İsmail Hakkı Boyacı</a>	Hacettepe University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Ankara	Turkey
<a href="#">Hale Seçilmiş Canbay</a>	Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Science and Arts, Chemistry Department	Burdur	Turkey
<a href="#">Mustafa Zafer Özel</a>	Sensient Flavors Ltd.	Milton Keynes	UK

## Gıda Ambalajlama / Food Packaging

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Zehra Ayhan</a>	Sakarya University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Sakarya	Turkey
<a href="#">Cengiz Caner</a>	Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Çanakkale	Turkey

## Süt Teknolojisi / Dairy Technology

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Mohamed H. Abd El-Salam</a>	Emeritus Professor, National Research Centre, Department of Dairy Sciences	Cairo	Egypt
<a href="#">Ayşe Sibel Akalın</a>	Ege University, Faculty of Agriculture, Dairy Technology Department	İzmir	Turkey
<a href="#">Meral Kılıç Akyılmaz</a>	İstanbul Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Food Engineering Department	İstanbul	Turkey
<a href="#">Tapani Alatossava</a>	University of Helsinki, Department of Food and Nutrition	Helsinki	Finland
<a href="#">Rajka Bozanic</a>	University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Department of Food Engineering	Zagreb	Croatia
<a href="#">Abdullah Çağlar</a>	Kocaeli University, Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Department Of Agricultural Economics	Kocaeli	Turkey
<a href="#">Songül Çakmakçı</a>	Atatürk University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Erzurum	Turkey
<a href="#">Ali Adnan Hayaloğlu</a>	İnönü University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Malatya	Turkey
<a href="#">Harun Kesenkaş</a>	Ege University, Faculty of Agriculture, Dairy Technology Department	İzmir	Turkey
<a href="#">Ahmet Küçükçetin</a>	Akdeniz University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Antalya	Turkey
<a href="#">Barbaros Özer</a>	Ankara University, Faculty of Agriculture/Department of Dairy Technology, Department of Dairy Technology	Ankara	Turkey
<a href="#">Harun Raşit Uysal</a>	Ege University, Faculty of Agriculture, Department of Dairy Technology	İzmir	Turkey
<a href="#">Yonca Yüceer</a>	Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Çanakkale	Turkey

## Yağ Teknolojisi / Oil and Fat Technology

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Aydın Yapar</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Denizli	Turkey
<a href="#">Emin Yılmaz</a>	Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Çanakkale	Turkey

## Hububat Teknolojisi / Cereal Technology

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Hülya Gül</a>	Süleyman Demirel University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Isparta	Turkey
<a href="#">Fatma Işık</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Denizli	Turkey
<a href="#">Ergun Köse</a>	Manisa Celal Bayar University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Manisa	Turkey
<a href="#">Pichan Prabasankar</a>	CSIR-Central Food Technological Research Institute, Flour Milling Baking and Confectionery Technology Department	Mysuru	India

## Et Teknolojisi / Meat Technology

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Nesimi Aktaş</a>	Nevşehir Hacı Bektaş Veli University, Faculty of Engineering and Architecture, Food Engineering Department	Nevşehir	Turkey
<a href="#">Haluk Ergezer</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Denizli	Turkey
<a href="#">Hüdayi Ercoşkun</a>	Çankırı Karatekin University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Çankırı	Turkey
<a href="#">Mükerrem Kaya</a>	Atatürk University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Erzurum	Turkey
<a href="#">Semra Kayaardı</a>	Manisa Celal Bayar University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Manisa	Turkey
<a href="#">Jung Hoon Lee</a>	Fort Valley State University, College of Agriculture, Family Sciences and Technology	Georgia	USA
<a href="#">Edward Pospiech</a>	Department of Animal Raw Materials, Institute of Meat Technology, Faculty of Food Sciences and Nutrition, Poznan University of Life Sciences,	Poznan	Poland
<a href="#">Fatma Meltem Serdaroğlu</a>	Ege University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	İzmir	Turkey
<a href="#">İsmail Yılmaz</a>	Namık Kemal University, Faculty of Agriculture, Food Engineering Dept.	Tekirdağ	Turkey

## Meyve-Sebze Teknolojisi / Fruit and Vegetable Technology

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Chockry Barbana</a>	Canadian Food Inspection Agency	Montréal	Canada
<a href="#">Utku Çopur</a>	Uludağ University, Faculty of Agriculture, Food Engineering Department	Bursa	Turkey
<a href="#">Seda Ersus</a>	Ege University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	İzmir	Turkey
<a href="#">Hakan Karaca</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Denizli	Turkey
<a href="#">Sebahattin Nas</a>	Pamukkale University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Denizli	Turkey
<a href="#">Ayhan Topuz</a>	Akdeniz University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Antalya	Turkey
<a href="#">Yakup Sedat Velioğlu</a>	Ankara University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Ankara	Turkey
<a href="#">Ünal Rıza Yaman</a>	Tire Kutsan Vocational School, Department of Food Technology	İzmir	Turkey
<a href="#">Oktay Yemiş</a>	Sakarya University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department	Sakarya	Turkey
<a href="#">Ufuk Yücel</a>	Ege University, Ege Vocational Training School, Department of Food Technology	İzmir	Turkey

## Sağlık, Beslenme, Toksikoloji ve Gıda / Health, Nutrition, Toxicology and Food

Name and Surname	Affiliation	City	Country
<a href="#">Adriana Pavesi Ariseto Bragotto</a>	State University of Campinas, Faculty of Food Engineering	Campinas	Brazil
<a href="#">Gözde Ede</a>	Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Health Sciences, Nutrition and Dietetic Department	Burdur	Turkey

**AKADEMİK GIDA****ABSTRACTED / INDEXED / LISTED IN**

1. Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases
2. Academic Index
3. Academic Keys
4. Academic Search Ultimate
5. Advanced Science Index (ASI)
6. AgBiotech News and Information
7. AgBiotechNet
8. Agricultural Economics Database
9. Agricultural Engineering Abstracts
10. Agroforestry Abstracts
11. Animal Breeding Abstracts
12. Animal Production Database
13. Animal Science Database
14. Asos İndeks
15. Biocontrol News and Information
16. Biofuels Abstracts
17. Botanical Pesticides
18. CAB Abstracts
19. CAB Direct
20. Cite Factor
21. Crop Science Database
22. CrossRef
23. Dairy Science Abstracts
24. Directory of Research Journals Indexing (DRJI)
25. EBSCO - Academic Search Ultimate Database
26. Environmental Impact
27. Environmental Science Database
28. Eurasian Scientific Journal Index
29. EuroPub
30. Field Crop Abstracts
31. Food Science and Technology Abstracts (FSTA)
32. Forest Science Database
33. Global Health
34. Google Scholar
35. Horticultural Science Abstracts
36. Horticultural Science Database
37. Impact Factor Services for International Journals (IFSIJ)
38. International Innovative Journal Impact Factor (IIJIF)
39. International Institute of Organized Research (I2OR)
40. İdeal Online
41. Maize Abstracts
42. MIAR (Information Matrix for the Analysis of Journals)
43. Nutrition Abstracts and Reviews Series A: Human and Experimental
44. Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock Feeds and Feeding
45. Nutrition and Food Sciences Database
46. Ornamental Horticulture
47. Parasitology Database
48. Plant Breeding Abstracts
49. Plant Genetic Resources Abstracts
50. Plant Genetics and Breeding Database
51. Plant Protection Database
52. Postharvest Abstracts
53. Potato Abstracts
54. Poultry Abstracts
55. Protozoological Abstracts
56. Review of Agricultural Entomology
57. Review of Aromatic and Medicinal Plants (RAMP)
58. Review of Medical and Veterinary Entomology
59. Review of Medical and Veterinary Mycology
60. Review of Plant Pathology
61. Rice Abstracts
62. Rural Development Abstracts
63. Science Library Index
64. Scientific Indexing Services (SIS)
65. SCOPUS
66. Seed Abstracts
67. Scilit
68. Soil Science Database
69. Soils and Fertilizers Abstracts
70. Soybean Abstracts
71. Sugar Industry Abstracts
72. Systematic Impact Factor (SIF)
73. The Belt and Road Initiative Reference Source
74. The Turkish Academic Network and Information Centre Life Sciences Database (TÜBİTAK-ULAKBİM Yaşam Bilimleri Veritabanı, TR-DİZİN)
75. Tropical Diseases Bulletin
76. Veterinary Science Database
77. VetMed Resource
78. Weed Abstracts
79. Wheat, Barley and Triticale Abstracts
80. World Agricultural Economics and Rural Sociology Abstracts (WAERSA)

Akademik Gıda 20 (2) (2022)  
**İÇİNDEKİLER / CONTENTS**

■ Editörden / Editorial

IV-V

■ MAKALELER / PAPERS

■ Araştırma Makaleleri / Research Papers

**Effect of Osmo- and Convective Dehydrofreezing on Energy Efficiency and Some Physicochemical Properties of Frozen Red Pepper** / Osmotik ve Konvektif Kurutma Sonrası Dondurma İşleminin Enerji Verimliliğine ve Kırmızıbiberin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi / Handan Başünal Gülmez, Ayhan Topuz

103-113

**Effect of Cooking Method on Heterocyclic Aromatic Amines Contents of Sucuk** / Sucuk Örneklerinin Heterosiklik Aromatik Amin İçeriğine Pişme Yönteminin Etkisi / Burcu Acar Çolakoğlu, Özgül Özdestand Ocak

114-121

**Effect of Collection Period and Irrigation Process on Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of Olive Leaves** / Zeytin Yapraklarının Antioksidan Aktivite ve Fenolik Bileşenleri Üzerine Sulama İşleminin ve Toplama Periyodunun Etkisi / Nurhan Uslu, Mehmet Musa Özcan

122-131

**Presence of Rotavirus and Astrovirus in Employees, Tools and Equipment of Slaughterhouses and Meat Processing Plants** / Mezbahalar ve Et İşleme Tesislerinin Çalışanları ile Alet ve Ekipmanlarında Rotavirus ve Astrovirus Varlığı / Halil Yalcin, Mehmet Kale, Oguz Gursoy, Hasbi Sait Saltik, Yusuf Yilmaz

132-137

**Effect of Using Green Tea (Camellia sinensis L.) Powder and Probiotic Bacteria on Probiotic Shelf Life and Quality Properties of Ice Cream** / Yeşil Çay (Camellia sinensis L.) Pudrası ve Probiyotik Bakteri Kullanımının Dondurmanın Probiyotik Raf Ömrü ve Kalite Özelliklerine Etkisi / Engin Gündoğdu, Hatice Ertem, Songül Çakmakçı

138-144

**Süt Tozu, Peyniraltı Suyu İzolatı veya İnülin ile Kurumaddesi Arttırılan ve Kalsiyum Klorür Eklenen Sütlerden Üretilen Probiyotik Yoğurtların Bazı Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri** / Some Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties of Probiotic Yoghurts Produced from Milk with Increased Dry Matter Content by Addition of Milk Powder, Whey Isolate or Inulin before and after Calcium Chloride Incorporation / Firuze Ergin

145-160

**Doğal Killerin Model Yağın Renk ve Fiziko-kimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi** / Effect of Natural Clays on Color and Physico-Chemical Properties of Model Oil / Didem Demir, Zeynep Gün, Emin Yılmaz

161-169

■ Derleme Makaleler / Review Papers

**A Plant-Based Milk Type: Hemp Seed Milk** / Bitkisel Sütlerden Biri: Kenevir Tohumu Sütü / Aysegul Besir, Nour Awad, Mustafa Mortas, Fehmi Yazici

170-181

**Dairy Products in Space Nutrition and Potential Processing of Dairy Products with 3D/4D Printers as a Space Food** / Uzayda Beslenmede Süt Ürünleri ve 3D/4D Yazıcılarla Üretilen Süt Ürünlerinin Uzay Gıdası Olarak Kullanım Olanakları / Anıl Bodruk, Furkan Acar

182-188

**Sürdürülebilir Beslenme ve Protein İhtiyacı İçin Alternatif Bir Kaynak: Sentetik Et (Kültür Eti)** / An Alternative Source for Sustainable Nutrition and Protein Needs: Synthetic Meat (Cultured Meat) / Mücahit Muslu

189-193

**Bakteriyosinler: Sınıflandırılmaları, Etki Mekanizmaları ve Gıda Muhafazasında Kullanımları** / Bacteriocins: Their Classification, Mechanisms of Action and Use in Food Preservation / Cesur Mehenktaş

194-198

■ Akademik Gıda Dergisi Yazım Kuralları / Guidelines to Authors

VI-IX

■ Etik Beyanı / Ethics and Publication Malpractice Statement

X-XV

**Sahibi**

SİDAS MEDYA AJANS TANITIM  
DANIŞMANLIK LTD. ŞTİ. Adına  
İmtiyaz Sahibi ve Yazı İşleri Sorumlusu  
Şakir SARIÇAY

**Genel Yayın Yönetmeni**

Şakir SARIÇAY  
info@akademikgida.com  
ssaricay@gmail.com

**Baş Editör**

Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY  
ogursoy@yahoo.com

**Editörler**

Prof. Dr. Özer KINIK  
Prof. Dr. Ramazan GÖKÇE  
Prof. Dr. Yusuf YILMAZ

**Reklam Müdürü**

Nurcan AKMAN ŞENGÖR

**Hukuk Danışmanı**

Av. Yrd. Doç. Dr. Murteza AYDEMİR

**Abone Sorumlusu**

Halil SOLAK

**Grafik Tasarım**

Sidas Medya Tasarım Grubu

**Yönetim Yeri**

Fevzipaşa Bulv. Çelik İş Merkezi  
No:162 Kat:3 D:302 Çankaya/İZMİR  
Tel: 0 232 441 60 01  
Fax: 0 232 441 61 06

Üç Ayda Bir Yayınlanan Dergimiz  
Basın Meslek İlkelerine Uymaktadır.

Yıl / Cilt: 20

Sayı: 96

Nisan - Mayıs - Haziran 2022

ISSN Print 1304-7582

ISSN Online 2148-015X

Akademik Gıda Dergisi

Bir **SİDAS MEDYA** Yayınıdır.

GRUP

Yayın Türü: Yerel Süreli  
Akademik Gıda Dergisi Hakemli Dergidir.

Akademik Gıda dergisinin 20. yayın yılının ikinci sayısında yine sizlerle birlikteyiz. Bu sayımızda 7 araştırma ve 4 derleme çalışması olmak üzere toplam 11 makale yer almaktadır.

Makale yazarlarından zaman zaman gelen sorular nedeniyle makale kabulü ile ilgili daha önce yaptığımız bilgilendirmeyi tekrar etmek istiyoruz. Dergimize yayımlanmak üzere gönderilen makalelerin kabulü halen <http://www.academicfoodjournal.com> adresinden yapılmakta olup, DergiPark üzerindeki makale kabul süreçlerini içeren sistem henüz kullanılmamaktadır.

Yazarlarımıza hatırlatmak istediğimiz diğer önemli bir husus 2020 yılından itibaren dergimize gönderilecek makalelerde Etik Kurul izni gerektiren çalışmaların ilgili izni aldıkları ile ilgili bilgi ve belgelerini dergimize (makalelerini dergimize gönderme aşamasında) sunmaları gerekliliğidir.

Dergimizin etik hususlarla ilgili detaylı etik beyanına web sayfamızdan (<https://dergipark.org.tr/tr/pub/akademik-gida/page/6477>) ulaşılabilir.

Ayrıca dergimizde araştırma makalelerinin ve İngilizce olarak yazılan makalelerin değerlendirme ve yayınlanma sürelerinin diğer makalelere kıyasla oldukça kısa olduğunu yazarlarımıza tekrar hatırlatmak istiyoruz.

Daha fazla ulusal ve uluslararası veri tabanı ve indekste dizinlenmek ve derginin uluslararası düzeyde tanınırlığını arttırmak için çalışmalarımızı sürdürdüğümüzü zaman zaman sizlere iletmiştik. Bu çalışmalarımız sonucunda dergimizin 15 Şubat 2022 tarihi itibarıyla SCOPUS veri tabanına kabul edildiğini sizlerle paylaşmaktan mutluluk duyuyoruz.

([https://www.elsevier.com/\\_data/assets/excel\\_doc/0015/91122/extlistJuly2022.xlsx](https://www.elsevier.com/_data/assets/excel_doc/0015/91122/extlistJuly2022.xlsx)). Dergimizin 2022 yılı ilk sayısında yer alan makalelere Haziran ayı itibarıyla SCOPUS veri tabanı üzerinden ulaşılabilir (Tüm makalelere erişim için Source Title kısmına Akademik Gıda yazılması gerekmektedir). Dergimizin kalitesini ve uluslararası alanda saygınlığını arttırabilmemiz için etki faktörünün yükseltilmesi başlıca hedeflerimiz arasındadır. Bu nedenle siz değerli bilim insanlarından gerek dergimize ve gerekse diğer ulusal ve uluslararası dergilere gönderdiğiniz makalelerde Akademik Gıda dergisinde yayımlanan makalelere mümkün olduğunca atıf yapmanızı tekrar rica ediyoruz.

Katkılarınızla dergimizin daha iyi noktalara geleceğine yürekten inanıyoruz. Bu sayının oluşmasında katkıda bulunan; çalışmalarını yayımlanmak üzere dergimize gönderen yazarlara ve bu çalışmaları titizlikle değerlendiren yayın kurulu üyelerimiz ve hakemlerimize teşekkürlerimizi sunuyoruz.

Saygılarımızla.

**Prof. Dr. Oğuz Gürsoy**  
Baş Editör

**Prof. Dr. Özer Kınık**  
**Prof. Dr. Ramazan Gökçe**  
**Prof. Dr. Yusuf Yılmaz**  
Editörler



## BİLİMSEL ETKİNLİKLER

### VI. International Joint Science Congress of Materials and Polymers

Malzeme Bilimleri alanında son gelişmelerin tartışılacağı VI. International Joint Science Congress of Materials and Polymers disiplinlerarası kongresi 2022 yılı Eylül ayında Arnavutluk'ta düzenlenecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <http://iscmp.org/> adresinden ulaşılabilir.

### Türkiye 14. Gıda Kongresi

İlki 25-27 Nisan 1978 tarihlerinde Gıda Teknolojisi Derneği ile Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği tarafından ortaklaşa düzenlenen Türkiye Gıda Kongrelerinin on dördüncüsü Gıda Teknolojisi Derneği tarafından çevrimiçi (online) olarak 19-21 Ekim 2022 tarihlerinde gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <https://gidakongresi2022.org/> adresinden ulaşılabilir.

### Ulusal Meyvecilik Sempozyumu

Ulusal Meyvecilik Sempozyumu, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Meyvecilik Araştırma Enstitüsü tarafından "Gıda Güvencesi Açısından Meyvecilik" temasıyla 27-30 Eylül 2022 tarihleri arasında Eğirdir'de düzenlenecektir. Sempozyum ile ilgili bilgilere <https://meyveciliksempozyumu.com/> adresinden ulaşılabilir.

### 7. Uluslararası Gıda Güvenliği Kongresi

Ülkemizde ve bölgemizde ana teması sadece "gıda güvenliği" olan tek uluslararası kongre olma özelliğini taşıyan Gıda Güvenliği Kongresi'nin 7.'si Gıda Güvenliği Derneği tarafından 3-4 Kasım 2022 tarihinde İstanbul'da gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <https://www.gidaguvenglikongresi.org/> adresinden ulaşılabilir.

### Sürdürülebilir Gıda Sistemleri Kongresi

Manisa Celal Bayar Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü tarafından düzenlenecek olan ve gıdada sürdürülebilirlik konusu ile ilgili her alandan değerli bilim insanlarını, kamu kurum ve kuruluşlarının yetkililerini ve özel sektör temsilcilerini bir arada buluşturmayı hedeflenen Sürdürülebilir Gıda Sistemleri Kongresi 10-12 Kasım 2022 tarihlerinde Manisa'da gerçekleştirilecektir. Kongre ile ilgili bilgilere <https://surdurulebilirgida.mcbu.edu.tr/> adresinden ulaşılabilir.

### V. Geleneksel Gıdalar Sempozyumunu

Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa Teknik Üniversitesi, Tarım ve Orman Bakanlığı, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası ve TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası tarafından beşincisi düzenlenecek olan Geleneksel Gıdalar Sempozyumunu, 24-26 Kasım 2022 tarihleri arasında Bursa Uludağ Üniversitesi ev sahipliğinde hibrit olarak gerçekleştirilecektir. Sempozyum ile ilgili bilgilere <https://gelenekselgidalar.org/tr/> adresinden ulaşılabilir.

## Effect of Osmo- and Convective Dehydrofreezing on Energy Efficiency and Some Physicochemical Properties of Frozen Red Pepper

Handan Başüenal Gülmez<sup>1</sup> , Ayhan Topuz<sup>2</sup>  

<sup>1</sup>Akdeniz University, Institute of Natural and Applied Sciences, 07058, Antalya, Turkey

<sup>2</sup>Akdeniz University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 07058, Antalya, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 12.04.2022, Accepted (Kabul Tarihi): 21.06.2022

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): [atopuz@akdeniz.edu.tr](mailto:atopuz@akdeniz.edu.tr) (A. Topuz)

☎ +90 242 310 24 47 📠 +90 242 310 63 06

### ABSTRACT

The effect of osmotic and convective drying treatments on main physicochemical properties of frozen sliced red peppers was investigated. Sliced red peppers were dried partially using either osmotic dehydration or convective hot air drying before freezing in an air blast freezer at constant air velocity (2 m/s) and temperature (-25°C). The center temperature of osmo- and convective dehydrofrozen peppers reached -25°C in about 105 min, while it took 270 min for control samples. Frozen samples were stored at -18±2°C for 60 days, and the color, texture, ascorbic acid, enzyme activities, antioxidant activity (DPPH and ORAC) and total carotenoid content of samples were monitored during storage. Results showed that skin puncture values of samples decreased by storage time. The ascorbic acid content of sliced red pepper decreased by both treatments and storage time. The antioxidant activity values of control samples were higher than those of convective dehydrofrozen and osmo-dehydrofrozen samples. Both partial drying treatments reduced carotenoid loss significantly. The losses in total carotenoid contents were 58.0, 47.5 and 46.9% at the end of the storage period in control, osmo-dehydrofrozen and convective dehydrofrozen peppers, respectively. Significantly lower energy was used in osmotic dehydration compared to convective drying since no heating required for osmotic dehydration. Moreover, pre-drying of sliced red pepper required one-third of lower energy for freezing compared to direct freezing. This study showed that osmo-dehydrofreezing can be an economical method for sliced red peppers production.

**Keywords:** *Capsicum annuum* L., Red pepper, Osmo-dehydrofreezing, Convective dehydrofreezing

### Osmotik ve Konvektif Kurutma Sonrası Dondurma İşleminin Enerji Verimliliğine ve Kırmızıbiberin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi

#### ÖZ

Osmotik ve konvektif kurutma işlemlerinin kısmen kurutularak dondurulmuş kırmızıbiber dilimlerinin başlıca fizikokimyasal özelliklerine etkisi araştırılmıştır. Dilimlenmiş kırmızıbiberler, osmotik dehidrasyon veya konvektif sıcak havayla kurutma sonrasında sabit hava hızında (2 m/s) ve sıcaklıkta (-25°C) bir dondurucuda dondurulmuştur. Dondurma işleminde kısmen kurutularak dondurulmuş biberlerin merkez sıcaklığı yaklaşık 105 dakikada -25°C'ye ulaşırken, kontrol örnekleri bu sıcaklığa 270 dakikada ulaşmıştır. Dondurulmuş örnekler 60 gün süreyle -18±2°C'de depolanmış olup, bu süreçte örneklerin renk, yapı, askorbik asit, enzim aktiviteleri, antioksidan aktivite (DPPH ve ORAC) ve toplam karotenoid içeriği takip edilmiştir. Yapı analiz sonuçları örneklerin kabuk delinme değerlerinin depolama süresi ile azaldığını göstermiştir. Dilimlenmiş kırmızıbiberin askorbik asit içeriği hem uygulamalar ile hem de depolama süresi ile azalmıştır. Kontrol örneklerinin antioksidan aktivite değerleri, osmo- ve konvektif kurutma ile kısmen kurutulduktan sonra dondurulmuş örneklerden daha yüksek bulunmuştur. Her iki kısmi kurutma işlemi de

karotenoid kaybını önemli ölçüde azaltmıştır. Kontrol örneği ile osmo- ve konvektif kurutma işlemleriyle kısmen kurutulduktan sonra dondurulmuş kırmızıbiberlerde depolama süresinin sonunda toplam karotenoid kayıpları sırasıyla %58.0, 47.5 ve 46.9 olarak tespit edilmiştir. Ozmotik dehidrasyon işleminde ısıtma gerekmediğinden, konvektif kurutmaya kıyasla daha düşük enerji girdisi hesaplanmıştır. Ayrıca dilimlenmiş kırmızıbiberin kısmi kurutma sonrası dondurma işleminde, doğrudan dondurmaya kıyasla üçte bir oranında daha düşük enerji kullanılmıştır. Bu çalışma, dilimlenmiş kırmızıbiber üretiminde ozmotik dehidrasyonla kısmi kurutma sonrası dondurma işleminin ekonomik bir yöntem olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Capsicum annuum L., Kırmızıbiber, Ozmotik kurutma, Konvektif kurutma

## INTRODUCTION

Pepper (*Capsicum annuum* L.) is in the family Solanaceae as potato, tomato, tobacco and petunia. The annual global production of pepper is about 30 million tons fresh fruits. Peppers are an excellent source of vitamin A, C and B. It also contains significant amount of magnesium, iron, thiamine, riboflavin and niacin [1]. It is widely used in production of paste, pickle, soups, ketchup, pizza, baby food, sausage, flavored cheese and stuffed olive etc.

Freezing is one of the most efficient methods to preserve food products in better qualities such as color, flavor, and nutritional value. On the other hand, it causes some losses especially in textural properties of the fruits and vegetables due to the formation of ice crystals. As a consequence of freezing the cellular membranes lose their semi-permeability and turgor [2]. Additionally, some biochemical deterioration reactions could occur especially during slow freezing [3]. Thus, prevention of textural losses and biochemical reactions is important. Therefore, dehydration pre-treatment have been applied before freezing to reduce the water content and limit ice crystal damage in foods [4]. Different drying techniques can be used as a pre-treatment. One of these techniques is osmotic dehydration that can be applied prior to freezing which is named as osmo-dehydrofreezing [5].

Osmotic dehydration is the phenomenon of partial removal of water from cellular materials by diffusion in a hypertonic solution [6, 7]. The mass transfer rate and efficiency of the osmotic process are dependent on various factors such as type and concentration of osmotic solution, solution temperature, ratio of the solution to food, pre-treatments, stirring and raw material properties [8-11]. As a result of osmotic dehydration prior to freezing, destruction of the integrity of cellular membrane is minimized and food quality is better preserved [12]. Moreover, osmotic pretreatment improves the texture characteristics [13, 14], reduces enzymatic browning [15], structural collapse and drip loss during thawing [16], energy demands for water freezing, costs of packaging, distribution and storage [17, 18].

There are many studies on the physicochemical quality of osmo-dehydrofrozen fruits and vegetables such as kiwi, pineapple, broccoli, rambutan, cucumber, apple, strawberry, potato, green pea, tomato, carrot, and apricot [19-21]. To the best of our knowledge, there is no study on osmo-dehydrofreezing of pepper.

Therefore, in the current study, the effectiveness of osmo-dehydrofreezing on some quality characteristics and energy efficiency of red pepper (*Capsicum annuum* L.) for frozen sliced red pepper production were comparatively investigated to convective dehydrofreezing. Additionally, frozen peppers without any pretreatment, osmo-dehydrofrozen and convective dehydrofrozen peppers were stored at  $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 60 days, and some physical (water activity, color, texture) and chemical (moisture, ascorbic acid, antioxidant activity, carotenoid, peroxidase, and lipoxygenase enzyme activity) properties of pepper samples were determined during storage. Energy consumption during each of the treatments was also calculated.

## MATERIALS and METHODS

### Materials

Fresh red peppers (*Capsicum annuum* L.) without any physical damage were purchased from a local market. Undamaged peppers were stored at  $+4^{\circ}\text{C}$  in the refrigerator until the treatments. For sample preparation, red peppers were cut into discs of  $6.0\pm 0.1$  mm in thickness using laser slicing knife after removal of their stems and seeds. Then, samples were blanched in water vapor under atmospheric pressure for 5 min to inhibit enzymatic activity prior to treatments (osmo-dehydrofreezing, convective dehydrofreezing and direct freezing).

Methanol (99.8%), metaphosphoric acid, fluorescein sodium salt, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Trolox®, 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), acetone (99.5%), sodium phosphate monobasic monohydrate, sodium phosphate dibasic heptahydrate, guaiacol (99%), hydrogen peroxide (50%), linoleic acid (99%) and Tween 20 were obtained from Sigma-Aldrich (Germany).

### Osmotic Dehydration

Osmotic dehydration was performed in 660 mL jars. Sorbitol and NaCl mixture (2.41:1) were used as osmotic agents at a total concentration of 27g/100mL. Approximately 30 g of sample were immersed into 450 mL osmotic solution. Dehydration was carried out in a thermostatic water bath maintained at  $25^{\circ}\text{C}$  under 140 rpm agitation for 90 min. At the end the osmotic drying treatment, samples were removed from the solution by draining, rinsed with distilled water, removed surface water with an absorbent paper. Then, the moisture content of osmotically dried red peppers was

determined. The conditions of osmotic dehydration were determined by preliminary studies to achieve 70.0% wet basis (w.b.) moisture content in the final product which was critical moisture content.

### Hot-Air Drying

Hot-air drying pretreatment of the sliced red pepper was performed in a tray dryer maintained at 60°C air temperature and 2 m/s air velocity. The samples were dried until 70.0% (w.b.) final moisture content.

### Freezing and Thawing

Freezing was performed in an air blast freezer (Ugur Ucf 10 Sf, İstanbul, Turkey) equipped with a fluidized bed air blower and three stage trays located on the blower. Freezing was achieved under constant air velocity (2 m/s) and temperature (-25°C). The fresh sliced red peppers (as control) were also frozen under same condition. During the freezing, air and sample temperatures were periodically recorded using type K thermocouple (Extech SDL 200, USA) at 5-s intervals. Three of the temperature probes were placed in the center of sliced red pepper on each tray and the other probe was located inside the freezer to measure ambient temperature. After freezing, samples were stored at -25°C for 2 months and physicochemical properties of the peppers were determined after frozen red pepper samples were thawed in a refrigerator at constant temperature (+4±1°C) overnight.

### Color Analysis

The color of sliced red pepper samples was measured using a colorimeter (UltraScan VIS HunterLab, USA) throughout the storage and expressed in *L* (darkness/whiteness), *a* (greenness/redness) and *b* (blueness/yellowness) [22]. It was carried out in three different parts of sliced red peppers and each value was reported as the mean of three replicates.

### Texture Analysis

Skin puncture force of the samples was conducted using a Texture Analyzer (TAXT plus Stable Microsystems, Godalming, Surrey, UK) using the method performed by [23] with slight modification. SMSP/5 probe was used in the analyses. For each treatment, skin puncture force was measured at three different samples on four different parts of each sample.

### Ascorbic Acid Content

Ascorbic acid content of the samples was determined by HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) according to [24] with some modifications. For this purpose, approximately 2 g of sliced red peppers were homogenized in 8 mL metaphosphoric acid (6%) for a minute using a rotor stator homogenizer (IKA K18, Germany). Extracts were centrifuged (Sigma 3-18K, Germany) at 10000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was filtered through a 0.45 µm filter and 20 µL of supernatant was injected into the HPLC system. Acidified MilliQ water (pH was

adjusted to 2.2 with sulfuric acid) was used as mobile phase at 0.8 mL/min. Separation of the peaks was done in a Nucleosil 5-C18 column (Macherey Nagel, Germany). The detection and quantification of the ascorbic acid were performed at 245 nm using the external standard of L-ascorbic acid.

### Peroxidase Activity

Enzyme extract for the determination of peroxidase activity was prepared by homogenizing of 5 g of sliced pepper in 10 mL sodium phosphate buffer (67mM, pH 6). After centrifugation at 12000 g for 10 min, the supernatant was filtered using Whatman 1 filter paper and used as enzyme extract in peroxidase activity assay. The activity of peroxidase was determined according to the method of [25]. The reaction mixture was contained 450 µL sodium phosphate buffer (67mM, pH 6), 1.25 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM), 1.25 mL guaiacol (30 mM) and 50 µL enzyme extract. Changes in absorbance at 420 nm were measured at 30-s intervals, for 10 min using spectrophotometer (Shimadzu 160A, Japan). The slope of linear part in absorbance-time curve was used in the calculation of the peroxidase activity and it was expressed as the change in absorbance per minute in mL enzyme extract.

### Lipoxygenase Activity

Enzyme extract was prepared by homogenizing 5 g of sliced pepper sample in 15 mL sodium phosphate buffer (50mM, pH 7) and clarified by a similar procedure used in peroxidase enzyme extract. Lipoxygenase activity was determined using the spectrophotometric method performed by [26]. To prepare substrate solution, 0.5 g Tween 20 and 0.5 g linoleic acid (99%) were shaken in an ultrasonic bath until its color became white and transferred into a flask. 1 mL NaOH (2N) was added to the flask and completed to 25 mL with distilled water (degassed). After 25 µL enzyme extract, 25 µL substrate solution and 3 mL sodium phosphate buffer (200mM, pH 6.5) were mixed in a quartz cuvette, absorbance change was recorded at 234 nm, for 2 min at 6-s intervals. The slope of linear part in absorbance-time curve was used in the calculation of the lipoxygenase activity and it was expressed as the change in absorbance per minute in mL enzyme extract.

### Antioxidant Activity

#### Free Radical Scavenging Capacity (DPPH)

In order to prepare the extract used in antioxidant activity assays, 5 g sample was homogenized in 15 mL ethanol (80%) for a minute and extracted for 30 min at room temperature in an ultrasonic bath. Then, extracts were centrifuged at 7000 g for 10 min and the supernatant was transferred into a test tube. The residue was reextracted and centrifuged again at the same conditions and the supernatants were combined [27, 28].

Free radical scavenging activity of the extracts was determined using the DPPH method [29]. For this

purpose, 50 µL extract was added into 950 µL of DPPH (60 µM, dissolved in methanol) and incubated for 30 min at room temperature in a dark place. After incubation, absorbance was measured at 516 nm. The inhibition of DPPH by the extract was used in the calculation of free radical scavenging activity using the plot obtained from the standard solution of Trolox®. The free radical scavenging activity was expressed as g Trolox® equivalent/100 g dry matter.

### Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

The determination of ORAC was performed according to [30]. For this purpose, 37 µL of phosphate buffer (75 mM, pH 7.4), 75 µL of the extract and 2750 µL of fluorescein (0.6136 µM) were mixed and incubated for 30 min at 37°C. 75 µL of AAPH solution (0.32 µM prepared in phosphate buffer) was then added. The fluorescence intensity was measured using fluorescence spectrophotometer (Cary Eclipse, Agilent Technologies, CA, USA) at excitation and emission wavelengths of 490 and 512 nm, respectively. Fluorescence intensities of

prepared solutions with phosphate buffer (blank) and Trolox® standard (100 µM) were also determined. The oxygen radical absorbance capacity was expressed as µM Trolox® equivalent/g dm using following equation (1):

$$\text{ORAC } (\mu\text{M TE}) = Df \times \frac{S_{\text{sample}} - S_{\text{blank}}}{S_{\text{Trolox}} - S_{\text{blank}}} \quad (1)$$

### Total Carotenoid Content

Total carotenoid content was determined using the spectrophotometric method reported by [31]. 0.5 g of the sample was extracted with 5 mL acetone-water (9:1, v/v) and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C. The same treatment was continued until extract was colorless and obtained extracts were combined and made up to 50 mL with acetone-water mixture. The absorbance of final solutions was measured by a spectrophotometer (Shimadzu UV1800, Tokyo, Japan) against acetone at 472 nm. Total carotenoid contents of samples were calculated according to the following equation (2.2):

$$\text{Total carotenoid content (mg/100g fresh pepper)} = \frac{\text{Abs} \times 50 \times 100}{\text{sample weight}} \quad (2)$$

### Energy Efficiency

The energy consumption during hot-air drying of sliced red peppers was calculated using equation (3) described by [32]

$$E = A \times v \times \rho \times c_p \times \Delta T \times t \quad (3)$$

The energy consumption during osmotic drying of sliced red peppers was calculated using below equations (4, 5, 6, 7, 8) according to [33];

$$Q = Q_{\text{OD}} + Q_i + E_p \quad (4)$$

$$Q_{\text{OD}} = m_{\text{mo}} \times c_{p_m} \times (t_r - t_0) + m_v \times c_{p_v} \times (t_r - t_0) \quad (5)$$

$$Q_i = W \times r \quad (6)$$

$$W = m_{\text{m(OD)}} \times (1 - (g_{\text{m(OD)}} / g_{\text{mk}})) \quad (7)$$

$$m_{\text{m(OD)}} = m_{\text{mo}} + m_w - m_{\text{sm}} \text{ (kg)} \quad (8)$$

The energy consumption during freezing of sliced red peppers was calculated using below equations (9, 10, 11, 12, 13, 14) used by [34], [35];

$$Q_1 = m \times c_{p1} \times \Delta T_1 \quad (9)$$

$$Q_2 = m \times L_g \quad (10)$$

$$L_g = 334 \times w \quad (11)$$

$$Q_3 = m \times c_{p2} \times \Delta T_2 \quad (12)$$

$$c_{p1} = 3.35w + 0.84 \quad (13)$$

$$c_{p2} = 1.26w + 0.84 \quad (14)$$

### Statistical Analysis

Treatments were performed triplicate and analyses were performed duplicate or triplicate. Results were subjected to variance analysis and appropriate means separation was conducted using Duncan's Multiple Range Test in SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## RESULTS and DISCUSSION

### Color

The color *L* values of all sliced frozen red peppers were between 31.09 and 33.73 during storage (Figure 1). During storage *a* and *b* values of frozen red peppers were between 29.18 and 34.02, 15.58 and 19.31, respectively (Figure 1). *a* and *b* values of control and convective dehydrofrozen samples were determined significantly ( $p < 0.05$ ) higher compared to osmo-dehydrofrozen samples. Control and convective dehydrofrozen samples presented higher color stability during frozen storage.

### Texture

Results showed that skin puncture forces of the frozen red peppers changed between 10.10 - 17.83 N and these values decreased during storage (Figure 2). Skin puncture force of control and osmo-dehydrofrozen samples were found to be similar but higher than convective dehydrofrozen samples. In a similar study, it was determined that the skin puncture values of the samples frozen after osmotic drying were high [21]. The researchers explained these differences in skin puncture force can be related to the increasing turgor pressure in the cell. In another study, it was reported that since the water content before freezing in the dehydrofreezing process decreases, the texture of the product will be less damaged by the less amount and small size of ice crystals [36]. Additionally, during the storage, skin puncture values were significantly different ( $p < 0.05$ ) in the control and convective dehydrofrozen samples.

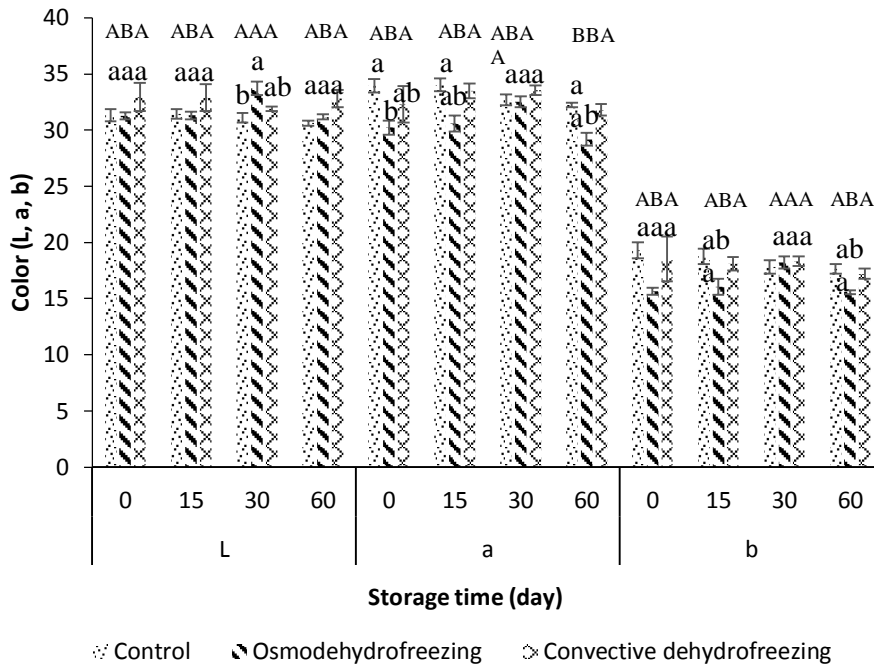


Figure 1. Changes in the color values of frozen red peppers during storage. The different lowercase letters (a–c) in the same storage time indicate significant differences within different treatments ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A–C) in the same treatment indicate significant differences within different storage times ( $p < 0.05$ ).

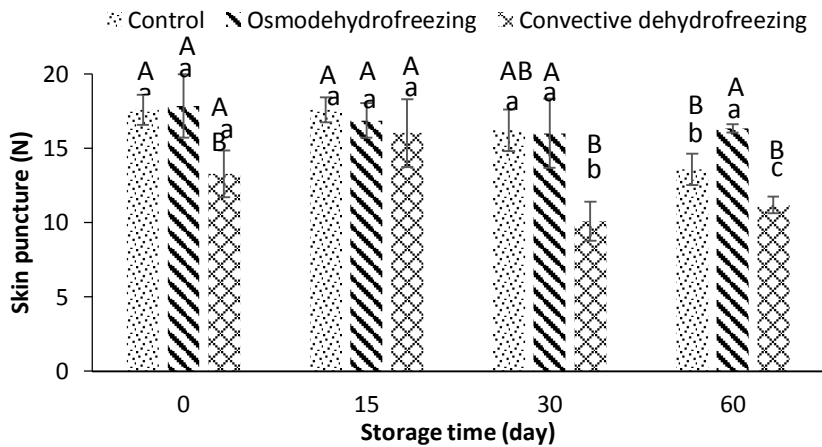


Figure 2. Changes in the skin puncture forces of frozen red peppers during storage. The different lowercase letters (a–c) in the same storage time indicate significant differences within different treatments ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A–C) in the same treatment indicate significant differences within different storage times ( $p < 0.05$ ).

### Ascorbic Acid Loss

The highest ascorbic acid loss was determined in osmo-dehydrofrozen red peppers. This could be related to the diffusion of ascorbic acid to the osmotic solution as well as chemical degradation during the osmotic dehydration process. Similar results were also reported by several researchers especially when applying high temperatures during dehydration [37-40]. Additionally, hot air-drying causing degradation of high amount of ascorbic due to oxidation reactions [41-44].

The ascorbic acid contents of frozen red peppers during storage were given in Figure 3. Storage test results revealed that, 78.16%, 84.32% and 97.53% of ascorbic acid was degraded at the end of 60 days of storage for the control, convective dehydrofrozen and osmo-dehydrofrozen samples, respectively. The ascorbic acid content of control and convective dehydrofrozen samples was similar to the initial content until the 15<sup>th</sup> day of the storage. However, a significant decrease in ascorbic acid content was determined at longer storage period. On the other hand, the amount of ascorbic acid in the osmo-dehydrofrozen samples steadily decreased from the beginning of the storage. At the end of the

storage, the highest amount of ascorbic acid was determined in control samples, while the osmo-

dehydrofrozen peppers had the lowest ascorbic acid content.

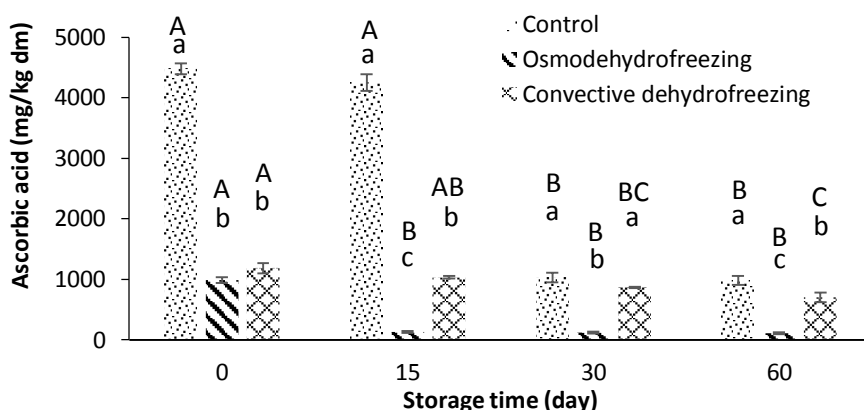


Figure 3. Changes in the ascorbic acid content of frozen red peppers during storage. The different lowercase letters (a–c) in the same storage time indicate significant differences within different treatments ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A–C) in the same treatment indicate significant differences within different storage times ( $p < 0.05$ ).

There are several studies on the loss of ascorbic content of frozen red pepper during storage. In a study, it determined that the ascorbic acid loss was 40% at the end of 30 days stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  [45]. However, in another study, higher ascorbic acid loss (97%) was reported at  $-22^{\circ}\text{C}$  stored frozen peppers for 30 days [46]. The variations in the studies could be related to the variety of pepper, pretreatments, and chemical composition of the samples.

### Peroxidase Activity

Results indicate that peroxidase enzyme was inactivated with the blanching of the samples. Additionally, no peroxidase enzyme activity was determined in the samples during storage period which indicates regeneration of peroxidase did not occur during storage.

### Lipoxygenase Activity

The highest lipoxygenase activity [ $22.59 \Delta\text{Abs}/(\text{min.mL})$ ] was determined in osmo-dehydrofrozen peppers which were followed by control and convective dehydrofrozen samples, respectively. The lowest lipoxygenase activity [ $15.35 \Delta\text{Abs}/(\text{min.mL})$ ] of the convective dehydrofrozen samples can be related to the partial inactivation of enzymes due to applied heat during hot air drying.

The lipoxygenase activity in all frozen sliced red peppers decreased by the storage (Figure 4). Similarly, [47] showed that lipoxygenase activity of blanched green bean samples decreased during storage at  $-18^{\circ}\text{C}$ . Additionally, this decreasing trend was signified in pre-dried samples. Therefore, it was interpreted that partial drying treatments reduced the loss of carotenoids catalyzed by lipoxygenase enzyme. At the end of the storage, pretreated samples had lower lipoxygenase activity compared to the control sample.

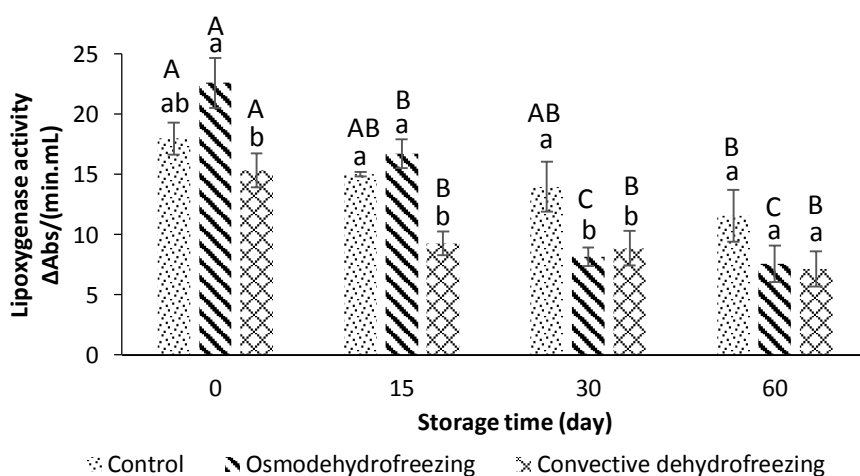


Figure 4. Changes in the lipoxygenase activity of frozen red peppers during storage. The different lowercase letters (a–c) in the same storage time indicate significant differences within different treatments ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A–C) in the same treatment indicate significant differences within different storage times ( $p < 0.05$ ).

## Antioxidant Activity

The antioxidant activity of samples was determined by DPPH radical scavenging activity and ORAC methods. According to DPPH and ORAC method, the antioxidant activity of the frozen red peppers was determined between 2.33-11.94 g Trolox<sup>®</sup> equivalent/100g dm and 64.49-197.50  $\mu$ M Trolox<sup>®</sup> equivalent/g dm, respectively. For both methods, the highest antioxidant activity was determined in control peppers and followed by

convective dehydrofrozen and osmo-dehydrofrozen samples, respectively (Figure 5-6). The lowest antioxidant activity of the osmo-dehydrofrozen peppers could be related to the diffusion of phenolic compounds into the osmotic solution. Additionally, these compounds may undergo structural changes due to oxidation especially during hot air drying. It was observed that the antioxidant activities of the samples changed significantly ( $p < 0.05$ ) depending on the treatment and storage time.

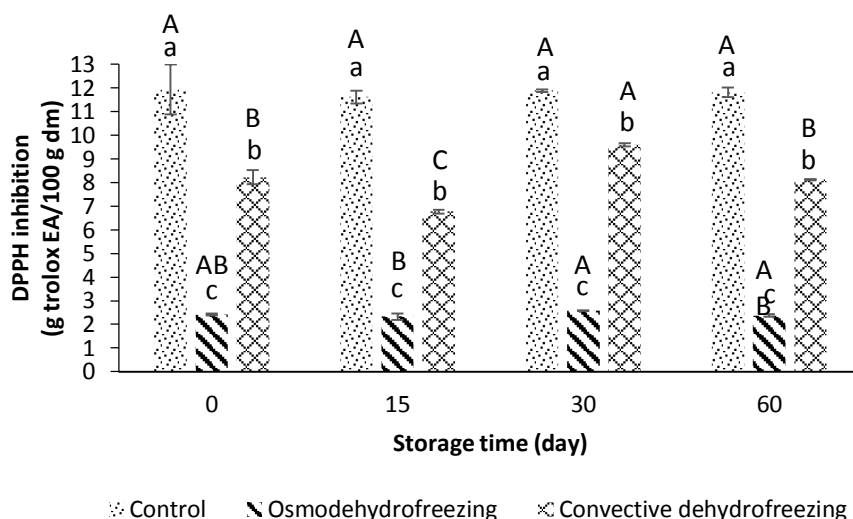


Figure 5. Changes in the antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity) of frozen red peppers during storage

The different lowercase letters (a-c) in the same storage time indicate significant differences within different treatments ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A-C) in the same treatment indicate significant differences within different storage times ( $p < 0.05$ ).

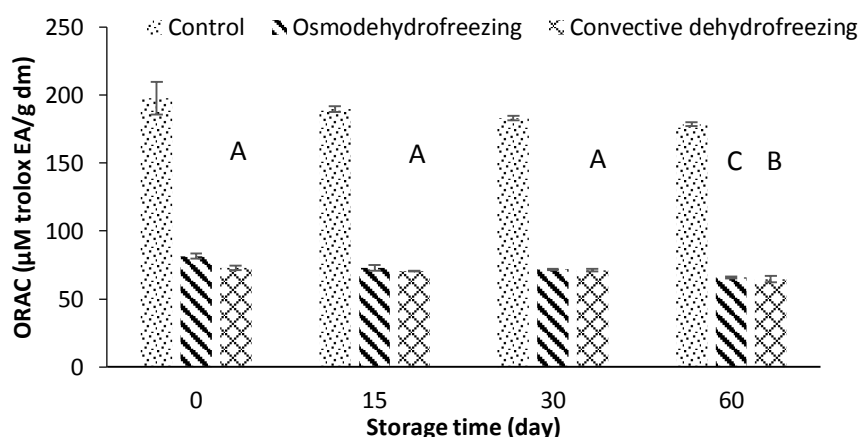


Figure 6. Changes in the antioxidant activity (ORAC) of frozen red peppers during storage

The different lowercase letters (a-c) in the same storage time indicate significant differences within different treatments ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A-C) in the same treatment indicate significant differences within different storage times ( $p < 0.05$ ).

## Total Carotenoid

Total carotenoid content (20.87 mg/100 g fw) of control samples was higher than the dehydrofrozen samples soon after processes (Figure 7). This can be explained by the degradation of carotenoids and pigment migration to solution during osmotic drying. Percent carotenoid loss was calculated as 57.97, 47.48, 46.93% control,

osmo-dehydrofrozen and convective dehydrofrozen samples at the end of the storage period, respectively. This could be relate to the lipoxygenase activity of the samples since lipoxygenase enzyme is catalyzing the degradation reactions of carotenoids [48]. Hence, results showed that lipoxygenase activity of control samples was higher than other samples during storage.



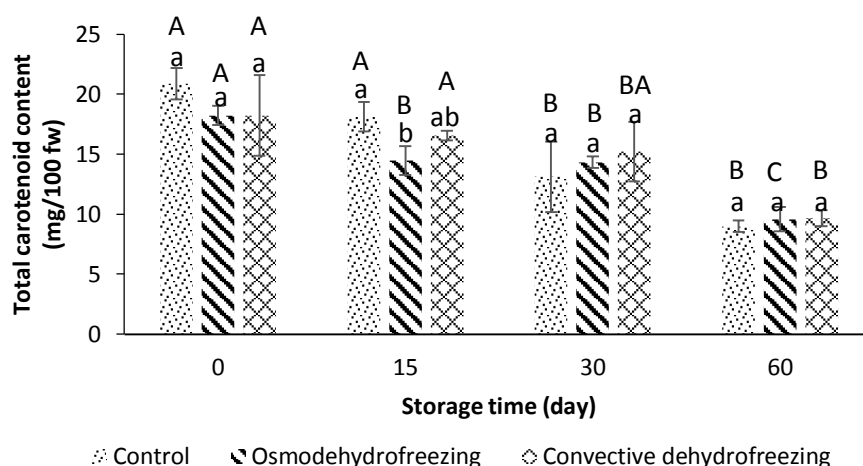


Figure 7. Changes in the total carotenoid content of frozen red peppers during storage. The different lowercase letters (a–c) in the same storage time indicate significant differences within different treatments ( $p < 0.05$ ). The different capital letters (A–C) in the same treatment indicate significant differences within different storage times ( $p < 0.05$ ).

### Energy Efficiency

Coefficients used to calculate energy consumption during osmotic dehydration and hot air drying of red peppers was given in Tables 1 and 2, respectively. QOD value was accepted zero since osmotic dehydration was done at room temperature.

Table 1. Coefficients used to calculate energy consumption during hot air drying

Equation constant	Value
A	1 (m <sup>2</sup> )
v	2 (m/s)
$\rho$	1.059 (kg/m <sup>3</sup> )
$c_p$	1.007 (kJ/kg.°C)
$\Delta T$	15 (°C)
t	3600 (s)
E	23034.52 (kJ/kg)

Table 2. Constants used to calculate energy consumption during osmotic drying

Equation variables	Value (kg)
$m_{mo}$	0.45
$m_w$	0.0108
$m_{sm}$	0.0033
$g_{m(OD)}$	0.12
$g_{mk}$	0.27

Table 3. The amount of energy consumption during osmotic drying

Stages	Energy (kJ/kg)
Qi	587.2
Ep	360.0
Q	947.2

Table 4. The removal energy from red pepper slices during freezing processes (frozen directly, osmodehydrofreezing and convective dehydrofreezing)

Treatments	Energy (kJ/kg)
Convective dehydrofreezing	371.91
Osmodehydrofreezing	368.90
Control	1164.49

When comparing the amount of energy consumption during pre-drying processes, approximately 25-fold energy is required for convective drying (23034.5 kJ/kg) of red pepper slices in comparison to osmotic dehydration (947.2 kJ/kg). In addition, 3 times higher energy must be removed for freezing of control samples (1164.49 kJ/kg) than dried samples (368.90-371.91 kJ/kg) (Tables 3 and 4).

### CONCLUSIONS

Sliced frozen red pepper is used in preparing several meat and vegetable meals, sauces, pizzas, salads in restaurants, hotels, caterings, or houses. In this

research, it was aimed to reduce energy consumption during freezing process of sliced frozen red peppers by applying convective pre-drying and osmotic dehydration. Additionally, some physicochemical properties were tested comparatively to directly frozen peppers. According to energy consumption calculations, osmotic dehydration was more advantageous than convective pre-drying. On the other hand, convective pre-drying was more successful in preserving physical and chemical quality characteristics of sliced red peppers. Moreover, pre-drying of sliced red pepper required one third of lower energy for freezing compared to direct freezing. Results indicated that osmotic dehydration is an economical alternative processing step for sliced

frozen red pepper. Nowadays, it is thought that osmotic dehydration can be an alternative to convective drying in the production of dehydrofrozen products. In addition, it will be possible to increase production by consuming less energy by semi-drying before freezing in frozen pepper production. For this reason, it is thought that osmotic drying is a preferable method in terms of energy efficiency and product quality for dehydrofrozen products. However, further studies are needed to prevent the diffusion of bioactive compounds to the osmotic solutions.

## NOMENCLATURE

A	cross-sectional area of drying chamber (m <sup>2</sup> )
C <sub>p</sub>	specific heat of the air (kJ/kg×°C)
cp <sub>m</sub>	specific heat of osmotic solution (kJ/kg×K)
cp <sub>v</sub>	specific heat of pepper (kJ/kg×K)
C <sub>p1</sub>	the specific heat in the temperature above the freezing point of the pepper (kJ/kg×K)
C <sub>p2</sub>	specific heat in the temperature below the freezing point of the pepper (kJ/kg×K)
D <sub>f</sub>	dilution factor,
E	total energy (kJ/kg)
E <sub>p</sub>	the mechanical energy required for the pump (kJ)
g <sub>m(OD)</sub>	experimentally measured total solids in the solution after osmotic drying
L <sub>g</sub>	freezing latent heat of pepper (kJ/kg)
m	amount of frozen pepper (kg)
m <sub>mo</sub>	amount of osmotic solution (kg)
m <sub>m(OD)</sub>	the amount of the solution after osmotic drying (kg)
m <sub>sm</sub>	the amount of dry matter of the solution (SG) (kg)
m <sub>v</sub>	amount of the red pepper (kg)
mw	the amount of moisture removed from fruits (WL) (kg)
Q	total energy consumption during osmotic drying (kJ)
Q <sub>i</sub>	energy consumption for evaporation of osmotic solution (kJ)
Q <sub>OD</sub>	energy consumption for heating during osmotic drying (kJ)
Q <sub>1</sub>	the energy required for the temperature of pepper to decrease to the freezing point (kJ/kg)
Q <sub>2</sub>	the energy at the freezing point (kJ/kg)
ρ	air density (kg/m <sup>3</sup> )
R	water-vapor change heat (kJ/kg)
S <sub>sample</sub>	fluorescence intensity of sample
S <sub>blank</sub>	blank
S <sub>Trolox</sub>	Trolox
t	drying time (s)
t <sub>r</sub>	temperature of osmotic solution (°C)
t <sub>0</sub>	ambient temperature (°C)
v	air velocity (m/s)
W	the amount of water that is removed from the osmotic solution by evaporation (kg)
w	the water content of pepper (g/100g).
ΔT	temperature difference (°C)
ΔT <sub>1</sub>	difference in temperature between initial temperature and freezing temperature of pepper (°C)
ΔT <sub>2</sub>	difference between the freezing point and the final temperature (-25°C) of the pepper

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank The Scientific Research Projects Coordination Unit of Akdeniz University (Antalya, Turkey) for financial support (Project Number: FYL-2015-616). In addition, they would like to thank The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (General Domestic PhD Scholarship Program) for support graduate education.

## REFERENCES

- [1] Andrews, J. (1999). The Pepper Trail. The University of North Texas Press, Texas.258 s.
- [2] Tregunno, N., Goff, H. (1996). Osmodehydrofreezing of apples: structural and textural effects. *Food Research International*, 29(5), 471-479.
- [3] Talens, P., Escriche, I., Martinez-Navarrete, N., Chiralt, A. (2003). Influence of osmotic dehydration and freezing on the volatile profile of kiwi fruit. *Food Research International*, 36(6), 635-642.
- [4] Chiralt, A., Martinez-Navarrete, N., Martinez-Monzó, J., Talens, P., Moraga, G., Ayala, A., Fito, P. (2001). Changes in mechanical properties throughout osmotic processes: Cryoprotectant effect. *Journal of food Engineering*, 49(2), 129-135.
- [5] Schudel, S., Prawiranto, K., Defraeye, T. (2021). Comparison of freezing and convective dehydrofreezing of vegetables for reducing cell damage. *Journal of Food Engineering*, 293, 110376.
- [6] Raoult-Wack, A., Lenart, A., Guilbert, S., Mujumdar, A. (1992). Recent advances in dewatering through immersion in concentrated solutions ('Osmotic dehydration'), Elsevier Science Amsterdam,
- [7] Eroglu, E., Yildiz, H. (2010). Recent developments in osmotic dehydration. *Akademik Gıda*, 8(6), 24-28.
- [8] Ponting, J., Watters, G., Forrey, R., Jackson, R., Stanley, W. (1966). Osmotic dehydration of fruits. *Food Technology*, 20(10), 125-128.
- [9] Lazarides, H.N., Mavroudis, N.E. (1996). Kinetics of osmotic dehydration of a highly shrinking vegetable tissue in a salt-free medium. *Journal of food Engineering*, 30(1), 61-74.
- [10] Rastogi, N., Eshtiaghi, M., Knorr, D. (1999). Accelerated mass transfer during osmotic dehydration of high intensity electrical field pulse pretreated carrots. *Journal of food science*, 64(6), 1020-1023.
- [11] Ade-Omowaye, B., Taiwo, K., Eshtiaghi, N., Angersbach, A., Knorr, D. (2003). Comparative evaluation of the effects of pulsed electric field and freezing on cell membrane permeabilisation and mass transfer during dehydration of red bell peppers. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(2), 177-188.
- [12] Goula, A.M., Lazarides, H.N. (2012). Modeling of mass and heat transfer during combined processes of osmotic dehydration and freezing (osmo-dehydro-freezing). *Chemical Engineering Science*, 82, 52-61.

- [13] Torreggiani, D. (1995). Technological aspects of osmotic dehydration in foods. Technomic Publisher, Lanchester, PA, 281-304.
- [14] Robbers, M., Singh, R., Cunha, L.M. (1997). Osmotic-convective dehydrofreezing process for drying kiwifruit. *Journal of food science*, 62(5), 1039-1042.
- [15] Conway, J., Castaigne, F., Picard, G., Vovan, X. (1983). Mass transfer considerations in the osmotic dehydration of apples. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 16(1), 25-29.
- [16] Forni, E., Torreggiani, D., Crivelli, G., Maestrelli, A., Bertolo, G., Santelli, F. 1987. Influence of osmosis time on the quality of dehydrofrozen kiwi fruit. I International Symposium on Kiwifruit 282, 425-434 ss,
- [17] Huxsoll, C. (1982). Reducing the refrigeration load by partial concentration of foods prior to freezing. *Food Technology*, 5, 98-102.
- [18] Lazarides, H.N., Mavroudis, N.E. (1995). Freeze/thaw effects on mass transfer rates during osmotic dehydration. *Journal of food science*, 60(4), 826-828.
- [19] Giannakourou, M.C., Dermesonlouoglou, E.K., Taoukis, P.S. (2020). Osmodehydrofreezing: An integrated process for food preservation during frozen storage. *Foods*, 9(8), 1042.
- [20] Dermesonlouoglou, E., Zachariou, I., Andreou, V., Taoukis, P.S. (2018). Quality assessment and shelf life modeling of pulsed electric field pretreated osmodehydrofrozen kiwifruit slices. *International Journal of Food Studies*, 7(1).
- [21] Xin, Y., Zhang, M., Adhikari, B. (2014). Freezing characteristics and storage stability of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. botrytis L.) under osmodehydrofreezing and ultrasound-assisted osmodehydrofreezing treatments. *Food and bioprocess technology*, 7(6), 1736-1744.
- [22] Topuz, A. (2008). A novel approach for color degradation kinetics of paprika as a function of water activity. *LWT-food science and technology*, 41(9), 1672-1677.
- [23] Vega-Gálvez, A., Di Scala, K., Rodríguez, K., Lemus-Mondaca, R., Miranda, M., López, J., Perez-Won, M. (2009). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). *Food Chemistry*, 117(4), 647-653.
- [24] Asami, D.K., Hong, Y.-J., Barrett, D.M., Mitchell, A.E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1237-1241.
- [25] Žilić, S., Serpen, A., Akilloğlu, G., Janković, M., Gökmen, V. (2012). Distributions of phenolic compounds, yellow pigments and oxidative enzymes in wheat grains and their relation to antioxidant capacity of bran and debranned flour. *Journal of cereal science*, 56(3), 652-658.
- [26] Jarén-Galán, M., Mínguez-Mosquera, M.I. (1999). Effect of pepper lipoxygenase activity and its linked reactions on pigments of the pepper fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4532-4536.
- [27] Arslan, D., Özcan, M. (2011). Dehydration of red bell-pepper (*Capsicum annuum* L.): Change in drying behavior, colour and antioxidant content. *Food and bioproducts processing*, 89(4), 504-513.
- [28] Zhang, D., Hamauzu, Y. (2003). Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *J. Food Agric. Environ*, 1(2), 22-27.
- [29] Fernández-León, M., Fernández-León, A., Lozano, M., Ayuso, M., González-Gómez, D. (2013). Altered commercial controlled atmosphere storage conditions for 'Parhenon'broccoli plants (*Brassica oleracea* L. var. italica). Influence on the outer quality parameters and on the health-promoting compounds. *LWT-food science and technology*, 50(2), 665-672.
- [30] Ena, A., Pintucci, C., Carozzi, P. (2012). The recovery of polyphenols from olive mill waste using two adsorbing vegetable matrices. *Journal of biotechnology*, 157(4), 573-577.
- [31] Chuah, A.M., Lee, Y.-C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.-J., Matoba, T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*, 111(1), 20-28.
- [32] Motevali, A., Minaei, S., Khoshtagaza, M.H. (2011). Evaluation of energy consumption in different drying methods. *Energy conversion and management*, 52(2), 1192-1199.
- [33] Kuljanin, T., Mišljenović, N., Koprivica, G., Lević, L., Jevrić, L., Pejić, D. (2011). Energy and material balance of the osmotic dehydration with evaporation and osmotic solution recirculation. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 15(4), 235-238.
- [34] Sahin, S., Sumnu, S.G. (2006). Thermal properties of foods, Springer, New York
- [35] Siebel, J. (1892). Specific heat of various products. *Ice & Refrig.*, 2, 256.
- [36] Tumer, E., Tulek, Y. (2021). Effects of dehydrofreezing conditions on carrot  $\beta$ -carotene and kinetics of  $\beta$ -carotene change in dehydrofrozen carrots during storage. *Food Science and Technology*, 42, <https://doi.org/10.1590/fst.70220>
- [37] Ade-Omowaye, B., Rastogi, N., Angersbach, A., Knorr, D. (2002). Osmotic dehydration of bell peppers: influence of high intensity electric field pulses and elevated temperature treatment. *Journal of food Engineering*, 54(1), 35-43.
- [38] Vial, C., Guilbert, S., Cuq, J. (1991). Osmotic dehydration of kiwi fruits: influence of process variables on the color and ascorbic acid content. *Sciences des aliments*, 11(1), 63-84.
- [39] Kim, B.-Y., Lee, K.-H. (2009). Effect of freezing on the physicochemical properties of semi-dried red pepper. *Korean Journal of Food Preservation*, 16(3), 362-370.
- [40] Ramallo, L., Mascheroni, R. (2010). Dehydrofreezing of pineapple. *Journal of Food Engineering*, 99(3), 269-275.
- [41] Inyang, U., Ike, C. (1998). Effect of blanching, dehydration method and temperature on the

- ascorbic acid, colour, sliminess and other constituents of okra fruit. *International journal of food sciences and nutrition*, 49(2), 125-130.
- [42] Lemus-Mondaca, R., Miranda, M., Grau, A.A., Briones, V., Villalobos, R., Vega-Gálvez, A. (2009). Effect of osmotic pretreatment on hot air drying kinetics and quality of Chilean papaya (*Carica pubescens*). *Drying Technology*, 27(10), 1105-1115.
- [43] Piga, A., Pinna, I., Özer, K.B., Agabbio, M., Aksoy, U. (2004). Hot air dehydration of figs (*Ficus carica* L.): drying kinetics and quality loss. *International journal of food science & technology*, 39(7), 793-799.
- [44] Vega-Gálvez, A., Lemus-Mondaca, R., Bilbao-Sáinz, C., Fito, P., Andrés, A. (2008). Effect of air drying temperature on the quality of rehydrated dried red bell pepper (var. Lamuyo). *Journal of food Engineering*, 85(1): 42-50.
- [45] Martínez, S., López, M., González-Raurich, M., Bernardo Alvarez, A. (2005). The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *International journal of food sciences and nutrition*, 56(1), 45-51.
- [46] Oruna-Concha, M., Gonzalez-Castro, M., Lopez-Hernandez, J., Simal-Lozano, J. (1998). Monitoring of the vitamin C content of frozen green beans and Padrón peppers by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(3):477-480.
- [47] Bahçeci, K.S., Serpen, A., Gökmen, V., Acar, J. (2005). Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Journal of food Engineering*, 66(2), 187-192.
- [48] Kanner, J., Mendel, H., Budowski, P. (1977). Carotene oxidizing factors in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.): peroxidase activity. *Journal of food science*, 42(6), 1549-1551.
-

## Effect of Cooking Method on Heterocyclic Aromatic Amines Contents of Sucuk

Burcu Acar Çolakoğlu , Özgül Özdehan Ocak  

Ege University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 35100, Bornova, Izmir, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 09.09.2021, Accepted (Kabul Tarihi): 10.06.2022

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): [ozgul.ozdehan@ege.edu.tr](mailto:ozgul.ozdehan@ege.edu.tr) (Ö. Özdehan Ocak)

☎ +90 232 311 1315 📠 +90 232 311 4831

### ABSTRACT

In this study, we aimed to find the influence of different levels of doneness (rare, medium, over-cooked) on the formation of heterocyclic aromatic amines (HCAs) in Turkish fermented beef sausages (sucuk) cooked by pan-frying method. Six types of HCAs were determined at three different temperatures. Determination of HCA was made using a high performance liquid chromatography (HPLC). IQ, MeIQx and 4,8-DiMeIQx were detected and quantified with DAD detector and PhIP, norharman and harman were determined with fluorescence detector. External standard and recovery methods were both used for the calculation amount of HCAs to obtain results that are more accurate. HCA and soluble protein analyses were performed in rare, medium and over-cooked sucuk samples. Moisture, ash, protein, lipid contents and pH analyses were performed in raw sucuk samples. Total HCA content of sucuk samples was found between 0.65 and 17.90 ng/g. Total HCA content of over-cooked sucuk samples were higher than rare-cooked sucuk samples ( $P<0.05$ ). Norharman was found as the most abundant HCA in sucuk samples, followed by PhIP, 4,8-DiMeIQx and IQ, respectively.

**Keywords:** Heterocyclic aromatic amine, HPLC, Sucuk

### Sucuk Örneklerinin Heterosiklik Aromatik Amin İçeriğine Pişme Yönteminin Etkisi

#### ÖZ

Bu çalışmada farklı pişirme derecelerinin (az pişmiş, normal pişmiş ve çok pişmiş) tavada kızartma yöntemi ile pişirilen sucuk örneklerinin heterosiklik aromatik amin (HCA) içerikleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Örneklerde üç farklı sıcaklıkta, altı farklı HCA belirlenmiştir. HCA'ların analizi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. IQ, MeIQx ve 4,8-DiMeIQx DAD dedektörde, PhIP, norharman ve harman floresans dedektörde tespit edilmiştir. Doğru sonuçlar elde etmek için HCA miktarlarının hesaplanmasında dış standart ve geri kazanım yöntemleri kullanılmıştır. Tüm pişmiş sucuk örneklerinde HCA ve çözünür protein analizleri gerçekleştirilmiştir. Pişmemiş sucuk örneklerinde nem, kül, protein, lipid ve pH analizleri gerçekleştirilmiştir. Sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği 0.65 ile 17.90 ng/g arasında bulunmuştur. Çok pişmiş sucuk örneklerinin toplam HCA içeriği, az pişmiş örneklerinkinden fazla bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Örneklerde en fazla bulunan HCA norharmandır. Norharmandan sonra sucuk örneklerinde sırasıyla PhIP, 4,8-DiMeIQx ve IQ tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Heterosiklik aromatik amin, HPLC, Sucuk

## INTRODUCTION

Heterocyclic aromatic amines (HCAs) occur while thermal processing of protein-rich foods [1]. These substances have been reported in thermally processed muscle tissues [2]. Currently above 25 different types of HCAs were known in cooked proteinaceous foods such as meat [3]. The most common HCAs are the thermally formed ones [4]. For instance, in beef, chicken and fish, HCAs can be found in higher concentrations, whereas HCA concentrations were lower in sausages and pork have upon cooking [5].

The amount of HCAs depends on the meat type, duration of cooking, cooking temperature, and browning degree in the course of heating [6]. It was also reported that heat and mass transfer, fat content, lipid oxidation, antioxidants, carbohydrates, free amino acids, and creatine, pH and water activity can affect the formation of HCAs [7-9]. To decrease the level of HCAs in meat products, antioxidants (vitamin E) or antioxidant-rich herbs (sage or thyme) can be added [10]. Type of cooking; such as grilling, frying, barbecuing, broiling or roasting; is another parameter that effects the formation and concentration of HCAs in meat [11].

HCAs have mutagenic and carcinogenic characteristics. For instance, HCAs can be 100-times and 2000-times more mutagenic compared to aflatoxin B1 and benzo[a]pyrene, respectively [7]. Rohrmann et al. [12] reported that probability of colorectal cancer increased upon concentration of HCAs more than 41.4 ng per day. In another study, it was also mentioned that consumed amount of food and intake frequency of HCAs were found important, besides the type of food and cooking method. As these compounds have mutagenic, carcinogenic or other health related adverse effects, the intake by human should be decreased as much as possible [9].

Currently, solid phase and solid-liquid extractions are used to extract HCAs and HPLC equipped with UV or fluorescence detectors is used to determine the HCAs. In addition, electro-spray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS) was found to detect HCAs in meat samples with a high accuracy and solid phase extraction by usage of two different cartridges was reported as the best sample preparation technic. Identification of these compounds using high technology equipment with an increased sensitivity could give rise to detect novel HCAs that have not been discovered yet [13].

Fermented meat products gain increasing attention worldwide and particularly in Turkey, sucuk as a fermented sausage is the most commonly consumed type [14]. Sucuk is prepared mainly by mixing lamb and beef meat with tail fat. Antimicrobials, antioxidants, starter culture and some spices are also added under controlled atmosphere to this mixture. When the mix, which is called sucuk dough, is ready, it is stuffed into an artificial or natural casing, that allows water evaporate and then fermentation occurs at a specified temperature and time [14]. According to Turkish food

legislation, sucuk contains 16% protein (as minimum) and the ratio of moisture content to protein content should be below 2.5. The ratio of fat content to protein content should be below 2.5. pH values of sucuk samples are acceptable as 5.4 as maximum value [15].

Because the formation of carcinogens is largely be affected by cooking methods and temperatures, recommendations about limiting their production during cooking could be the best public health protection system. Sucuk is one of the popular traditional Turkish meat products. To our knowledge, there is only one study [16] about the determination of HCA content of sucuk in literature. These authors studied the influence of spice and lipid types on HCAs in barbecued sucuk. However, they gave no data about norharman and harman content of sucuk samples. Therefore, the objective of this study was to determine the amounts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f] quinoxaline (4,8-DiMeIQx), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP), 9H-pyrido[3,4-b]indole (norharman) and 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole (harman) in ten fermented beef sausage (sucuk) samples bought from the markets in Turkey. And also, we aimed to investigate the effect of doneness (pan frying) levels on these heterocyclic aromatic amines in sucuk samples for the first time in literature. Our study is the first study about making survey about HCAs content of pan-fried sucuk samples. Pan-frying is the most common way for consumption of sucuk samples. So this study's results give information about prediction of HCAs exposure of people by consumption sucuk.

## MATERIALS and METHODS

### Materials

### Samples

Ten fermented beef sucuk samples of the different brand names were analyzed for the determination of HCA content. Three samples having different production number from each brand were used for the determination of HCA content. Sucuk samples were bought from the markets in Izmir, Turkey at the beginning of their shelf life. The width of sucuk sample was adjusted as 5 cm. Sucuk samples were cooked in a pan with an electrical cooker. These samples were cooked at 180°C for 90 seconds (rare cooked), 180 seconds (medium cooked) and 300 seconds (over cooked), respectively. So, for each sucuk sample, three different levels of doneness (rare, medium and over cooked) were obtained.

### Reagents

HPLC or analytical-reagent grade chemicals were used in all analyses. The Human Corporation Zeener Power I water purification system (Seoul, Republic of Korea) was used for obtaining ultra-pure distilled water.

The most abundant six HCAs found in cooked meat products were determined in this study. IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, and harman bought from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Norharman was purchased from Sigma (Steinheim, Germany). Two different cartridges (An Oasis MCX cartridge 3 cm<sup>3</sup>/60 mg, Waters, Milford, Massachusetts, USA and (Accubond C<sub>18</sub> cartridge, 3 cm<sup>3</sup>/200 mg, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) were used for sample preparation. Zinc sulfate heptahydrate was obtained from Riedel-de Haen (Seeize, Germany). HPLC-grade methanol and acetonitrile, acetic acid, Coomassie Brilliant Blue G-250, phosphoric acid (85%), sodium chloride, potassium dihydrogen phosphate, potassium hydrogen phosphate, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), bovine serum albumin, chloroform, and hydrochloric acid (37%) were all obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

One hundred mg/L stock individual HCA solutions in methanol were prepared. Standard solutions were prepared for HCA analyses for plotting calibration curve.

## Methods

### Heterocyclic Aromatic Amines Content Analysis

The method described by Özdehan et al. [17] was used for sample preparation for HCA analysis. Quantification

of IQ, MeIQx and 4,8-DiMeIQx were made by HPLC equipped with a diode array detector (DAD) (254 nm for IQ; 263 nm for MeIQx, and 4,8-DiMeIQx). BDS Hypersil C<sub>18</sub> (5 µm particle size, 150 mm × 4.6 mm i.d., Thermo Scientific) column was used for separation of HCAs. Chromatographic separations were performed by HPLC using a fluorescence detector (340 nm and 420 nm as excitation and emission wavelengths) for quantification of PhIP, norharman and harman. Injection volumes, mobil phases and flow rates were shown in Table 1. Two different gradient programs were used for separation of HCAs given in Table 1 (a) and (b).

Table 1 (a). Gradient elution program for separation of IQ, MeIQx, and 4,8 DiMeIQx

Time (minute)	A <sup>1</sup> (%)	B (%)
0	100	0
12	100	0
20	70	30
29	70	30
34	0	100
35	0	100
44	0	100
49	100	0
55	100	0

<sup>1</sup>A: methanol/acetonitrile/water/acetic acid (8:14:76:2, v/v/v/v) at pH 5.0, B: acetonitrile, Injection volume:20 µL

Table 1 (b). Gradient elution program for separation of PhIP, harman, and norharman

Time (minute)	A <sup>1</sup> (%)	B (%)	Flow rate (mL/min)
0	90	10	0.5
10	75	25	0.5
15	0	100	0.5
20	0	100	0.5
22	90	10	0.5
27	90	10	0.5

<sup>1</sup>A: 0.5 M ammonium acetate B: methanol Injection volume:15 µL

### Soluble Protein Analysis

Bradford [18]'s method was used for the determination of soluble protein content. The concentration of soluble protein in sucuk sample was determined by plotting calibration curve prepared by albumin fraction V standard.

### Proximate Composition Analysis

Moisture contents of samples were measured in accordance with Anon. [19]. AOAC [20] method was used for determination of ash content. Crude fat content was determined using the methanol-chloroform extraction method according to Folch et al. [21]. Crude protein content was analyzed in accordance with the Dumas method.

### pH Determination

For sample preparation, 10 g of sample was homogenized in 100 mL distilled water. A pH meter

(Hanna HI-221) was used for the determination pH value of samples. pH meter was calibrated at 20°C with buffer solutions [22].

### Apparatus

An Agilent 1200 liquid chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used for quantification of HCAs. Determination of soluble protein content was performed by a UV-visible spectrophotometer (Cary 50, Varian, UK). pH of samples were determined with a pH meter (Hanna HI-221, USA). Crude protein content of samples were determined by LECO FP-528 (Saint Joseph, USA). Nüve ES500 (Ankara, Turkey) oven was used for the determination of moisture content. IKA T25 Ultra-Turrax homogenizer (25,000 rpm, Staufen, Germany) and IEC CL31-CL31R Multispeed centrifuge (Thermo, San Diego, CA) were used in the extraction of samples.

**Statistical Analysis**

SPSS 24.0 statistics package program was used for evaluation of results statistically. One-way analysis of variance (ANOVA), Duncan post-test and Pearson correlation test were used (P<0.05). All trials were made as 3 replicates.

**RESULTS and DISCUSSION**

Moisture, ash, crude fat, crude protein contents and pH values of raw sucuk samples were given in Table 2. Similar results for chemical and physic-chemical analysis of raw sucuk samples were obtained with the

previous studies [16, 23]. And these values were generally suitable according to Turkish Food Legislation [15]. pH values of raw sucuk samples were found in the range of 4.87 and 5.57 with the mean value of 5.23. Moisture content of raw sucuk samples were between 33.10% and 52.50% with the mean value of 41.12%. Ash content of raw sucuk samples were found between 2.24% and 3.48% with the mean value of 2.88%. Crude fat and protein content of samples were between 22.73% and 44.56% and between 15.17% and 21.17%, respectively. Mean crude fat and protein content of samples were found as 36.31% and 17.79%, respectively.

Table 2. Moisture, ash, crude fat, crude protein contents (%) and pH values of sucuk samples (Mean ± standard deviation)

Samples	pH	Moisture content (% w/w)	Ash content (% w/w)	Crude fat content (% w/w)	Crude protein content (% w/w)
S1	5.41 <sup>b</sup> ±0.00	33.10 <sup>g</sup> ±0.15	3.48 <sup>a</sup> ±0.04	44.56 <sup>a</sup> ±0.44	17.44 <sup>c</sup> ±0.13
S2	5.29 <sup>c</sup> ±0.03	39.31 <sup>e</sup> ±0.84	3.22 <sup>b</sup> ±0.00	33.39 <sup>f</sup> ±0.11	21.17 <sup>a</sup> ±0.33
S3	5.47 <sup>a</sup> ±0.01	52.50 <sup>a</sup> ±0.56	2.92 <sup>c</sup> ±0.00	22.73 <sup>h</sup> ±0.02	17.54 <sup>c</sup> ±0.58
S4	5.01 <sup>e</sup> ±0.01	42.87 <sup>c</sup> ±0.58	2.27 <sup>f</sup> ±0.03	37.66 <sup>d</sup> ±0.35	17.71 <sup>c</sup> ±0.41
S5	5.30 <sup>c</sup> ±0.01	35.82 <sup>f</sup> ±0.96	3.28 <sup>b</sup> ±0.06	41.83 <sup>b</sup> ±0.20	16.44 <sup>d</sup> ±0.54
S6	5.11 <sup>d</sup> ±0.01	39.19 <sup>e</sup> ±0.52	2.24 <sup>f</sup> ±0.01	35.57 <sup>e</sup> ±0.35	15.17 <sup>e</sup> ±0.01
S7	5.45 <sup>ab</sup> ±0.01	38.56 <sup>e</sup> ±0.13	3.24 <sup>b</sup> ±0.01	38.50 <sup>c</sup> ±0.67	19.80 <sup>b</sup> ±0.25
S8	5.01 <sup>e</sup> ±0.04	40.99 <sup>d</sup> ±0.21	2.65 <sup>e</sup> ±0.026	34.88 <sup>e</sup> ±0.18	16.54 <sup>d</sup> ±0.54
S9	4.87 <sup>f</sup> ±0.03	48.28 <sup>b</sup> ±0.39	2.69 <sup>e</sup> ±0.04	32.13 <sup>g</sup> ±0.00	15.98 <sup>de</sup> ±0.11
S10	5.44 <sup>ab</sup> ±0.04	40.55 <sup>d</sup> ±0.59	2.85 <sup>d</sup> ±0.02	41.89 <sup>b</sup> ±0.01	20.15 <sup>b</sup> ±0.35

<sup>a</sup>Different matching letters in the same column mean significant differences between the samples according to Duncan test (P < 0.05). All the analyses were performed triplicate

The average recoveries for IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, harman, norharman and PhIP were found between 68.9 and 87.8%. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) values for this method were found as 0.27 and 0.80 ng/g for IQ, 0.86 and 2.59 ng/g for MeIQx, 1.40 and 4.40 ng/g for 4,8-DiMeIQx, 0.04 and 0.13 ng/g for PhIP, 0.65 and 1.96 ng/g for harman, 0.26 and 0.79 ng/g for norharman, respectively [17].

In Table 3, HCA amounts of sucuk samples prepared at different temperatures were shown. External standard and recovery methods were both used for the calculation amount of HCAs to obtain results that are more accurate.

IQ was only detected in one of the analyzed cooked sucuk sample (S3). IQ content of rare, medium and over-cooked sucuk samples were determined as 1.77 ng/g, 0.84 ng/g and 3.84 ng/g, respectively. These

values were similar with the literature values. But no IQ was detected in nine out of ten samples. This could be related with the matrix and chemical composition of sucuk. According to Skog et al. [6], IQ was not found in a solution containing creatine, glucose and amino acids that was cooked until 150-225°C between 0-120 minutes. On the other hand, Balogh et al. [24] reported that IQ was found as 0.7 and 1.3 ng/g in meatball samples cooked for 12 and 20 minutes at 175°C. In another study, IQ contents of hamburger meatball cooked at 170, 200 and 225°C were found as 1.1 ng/g, 5.46 ng/g and not determined, respectively [25]. Öz and Kaya [8] determined IQ content of grilled meatball at 175°C and 200°C and found 1.40 ng/g and 5.46 ng/g, respectively. Unal et al. [16] found IQ contents of barbecued sucuk samples between 0.85 ng/g and 5.96 ng/g.

Table 3. IQ, 4,8-DiMeIQx, PhIP and norharman contents of cooked sucuk samples (ng/g) (Mean ± standard deviation)

S	IQ			4,8-DiMeIQx			PhIP			Norharman			Total HCA		
	Rare cooked	Medium cooked	Over cooked	Rare cooked	Medium cooked	Over cooked	Rare cooked	Medium cooked	Over cooked	Rare cooked	Medium cooked	Over cooked	Rare cooked	Medium cooked	Over cooked
S1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.01 ±0.20	nd	10.44±0.11	9.74 <sup>b</sup> ±0.61	1.52 <sup>a</sup> ±0.34	12.23 <sup>b</sup> ±1.15
S2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.62 ±0.30	nd	nd	4.56 <sup>a</sup> ±0.27
S3	1.77±0.23	0.84 ±0.40	3.84 ±0.59	3.57±0.56	5.98 ±0.35	2.91 ±0.76	nd	nd	nd	9.44 ±0.02	9.02 ±3.02	10.02±0.00	14.84 <sup>a</sup> ±0.78	16.10 <sup>a</sup> ±0.69	17.89 <sup>a</sup> ±0.46
S4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.75±0.98	nd	nd	nd	nd	nd	9.75 <sup>a</sup> ±0.98	1.83 <sup>a</sup> ±0.05
S5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.41 <sup>d</sup> ±0.01	3.197 <sup>f</sup> ±0.167	3.63 <sup>a</sup> ±0.03
S6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6.21 ±0.31	6.01 ±0.30	nd	6.21 <sup>c</sup> ±0.30	6.02 <sup>a</sup> ±0.26	nd
S7	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6.11 ±0.51	10.54±1.41	6.65 <sup>f</sup> ±0.01	7.47 <sup>d</sup> ±0.44	11.47 <sup>a</sup> ±0.90
S8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.08 <sup>a</sup> ±0.13	nd	2.63 <sup>a</sup> ±0.07
S10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6.02 ±0.71	8.53 ±0.28	nd	9.31 ±0.30	6.01 ±1.01	nd	12.52 <sup>b</sup> ±1.73	17.71 <sup>a</sup> ±0.57

<sup>a</sup> Different matching letters in the same column mean significant differences between the samples according to Duncan test (P < 0.05) nd=not detected. All the analyses were performed triplicate



MeIQx was not detected in any of the analyzed samples in accordance with literature [6]. MeIQx was not quantified in cooked meatball samples for 8 minutes at 165–200°C by Johansson et al. [26]. Busquets et al. [27] did not find MeIQx in hamburger meatball samples cooked for 11.2 minutes at 175–200°C. MeIQx content of barbecued sucuk samples were found concentrations up to 0.21 ng/g by Unal et al. [16].

4,8-DiMeIQx was detected in only one of the analyzed cooked sucuk sample (S3). 4,8-DiMeIQx content of rare, medium and over-cooked sucuk samples were determined as 3.57 ng/g, 5.98 ng/g and 2.91 ng/g, respectively. These values were similar with the previous values reported in literature [28]. But no 4,8-DiMeIQx was detected in nine of the ten samples. This could be related with the matrix and chemical composition of sucuk. And also, the occurrence of HCAs is connected with meat type, pH, temperature and water activity. Heat and mass transfer, lipids, lipid oxidation, antioxidants and cooking methods such as barbecuing and grilling have some effects on the accumulation of HCAs. Natural or synthetic antioxidants are commonly used to prevent HCA formation in foods. Sucuk contains spices having antioxidant activity, this could be the main reason for detecting any 4,8-DiMeIQx in samples. Lipid content was also an important factor for the formation of HCAs. The influence of lipids on the formation of HCAs could be clarified by the enhanced formation of pyridines, pyrazines and Strecker aldehydes in the Maillard reaction or by the production of free radicals by means of thermic oxidation, or both.

Oz and Kaya [8] cooked meatballs containing black pepper with electrical grill. According to their results, 4,8-DiMeIQx was not determined in any samples. But they found different amounts of 4,8-DiMeIQx in control samples. This shows us that the spices are very important components affecting HCA amount of samples so it is normal not to detect 4,8-DiMeIQx in sample like sucuk that contains different spices. Unal et al. [16] found no 4,8-DiMeIQx in seven of the analyzed twelve sucuk samples. They quantified 4,8-DiMeIQx between 0.08 ng/g and 0.19 ng/g in five of the analyzed twelve samples.

PhIP was found in only two samples. PhIP concentration was found between 6.02 ng/g and 9.75 ng/g in accordance with literature [29]. Oz and Kaya [8] cooked meatballs containing black pepper with electrical grill. They did not find PhIP at any samples. PhIP was not found in five of the analyzed twelve samples by Unal et al. [16]. The concentration of PhIP was reported in between 0.36 ng/g and 1.94 ng/g.

Harman could not be detected in any of the cooked sucuk samples. Ahn and Grün [30] was found 10.88 ng/g harman in cooked meatball samples at 200°C for 20 minutes. However, these cooking temperatures are very high compared to our cooking temperatures. Therefore, the reason of formation or measurable higher concentration of harman could be the degree of heating temperature and time.

The concentration of norharman was found between 6.21 and 9.44 ng/g for rare-cooked; 6.01 and 9.31 ng/g for medium-cooked; and 6.01 and 10.54 ng/g for over-cooked sucuk samples. However, the concentration of norharman could not be detected in four samples. These values were similar compared to the literature values [30]. Ahn and Grün [30] determined norharman content of control cooked beef meatball samples as 5.55 ng/g, 0.5% grape seed extract containing samples as 5.38 ng/g and 1% grape seed extract containing samples as 5.16 ng/g.

Total HCA content of rare, medium and over-cooked samples were found between 0.65 ng/g and 14.84 ng/g; 1.52 ng/g and 16.10 ng/g; 1.83 ng/g and 17.89 ng/g, respectively. Mean total HCA content of rare, medium and over-cooked samples were calculated as 3.69 ng/g, 5.66 ng/g and 6.77 ng/g, respectively. It has been known that possibility of colorectal cancer increases upon consumption of HCAs more than 41.4 ng per day [12]. According to this information, it is recommended to consume pan-fried sucuk less than 2.3 g/day. Total HCA contents of rare, medium and over-cooked samples were significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). The highest total HCA content was belong to over-cooked sucuk samples and the lowest total HCA content was belong to rare cooked sucuk samples. According to Pearson correlation test, no significant correlation was found between total HCA content and lipid, protein, ash, dry matter, soluble protein content of rare, medium and over-cooked sucuk samples ( $P < 0.05$ ). No correlation was obtained between total HCA content and pH values of sucuk samples except over-cooked samples ( $P < 0.05$ ).

In a previous study, beef and chicken meatballs containing a 0.5% (w/w) pomegranate (PSE) and grape seed extract (GSE) were cooked using different methods and IQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, norharman, and harman were detected [31, 32]. In the control, GSE added and PSE added beef meatballs, total HCA contents were reported as 154.63 ng/g, 182.65 ng/g and 83.23 ng/g, respectively.

Unal et al. [16] evaluated the contribution of spices and animal fat to the formation of HCAs in barbecued sucuk and reported that the highest concentration of individual HCAs was 5.96 ng/g. They attributed the reason of low total HCA content in their samples to the presence of clove and cinnamon as spices. In a similar study, according to Murkovic et al. [33], spices can decrease the HCA amount in roasted meat.

There have been many studies about the determination of HCA content of meat products. To the best of our knowledge, there was no study about HCA formation in pan-fried sucuk samples, which were produced in Turkey. There is only one study on the formation of HCA in sucuk, which investigated the effects of different spices and fat types by Unal et al. [16], and in that study the presence or concentration of harman and norharman was not studied. However, in our study, we aimed to close the gap in literature by taking into account different cooking methods for sucuk preparation

and also the presence or formation of different HCAs in sucuk samples. Therefore, we aimed to make a survey about HCA content of sucuk samples produced and marketed in Turkey for the first time and also to investigate the effect of cooking temperature for pan frying on HCA content of sucuk samples.

Total HCA content of sucuk samples were lower compared to the most of the meat products. It could be related with chemical composition and raw materials (spices, food additives etc.) of sucuk. And also pan frying was used for cooking of sucuk samples. According to the results of different studies by using this cooking method, lower total HCA content is obtained compared to oven roasting and charcoal-barbecue.

According to Szterk [34], it was demonstrated that HCAs formation strongly correlates with the presence of various amino acids in raw beef as well as that of glucose and protein (correlation coefficient 0.84–0.93). Protein is precursor substance of HCA formation. Therefore, it is important to determine soluble protein content of sucuk samples. Soluble protein content of sucuk samples cooked at different temperatures were given in Table 4. Soluble protein content of samples were found between 19.00 mg/100 g and 57.60 mg/100 g; 23.90 mg/100 g and 41.80 mg/100 g; 24.40 mg/100 g and 53.20 mg/100 g for rare, medium and over-cooked samples, respectively. Statistically significant differences were found between soluble protein content of rare, medium and over cooked sucuk samples (P<0.05).

Table 4. Soluble protein content (mg/100 g) of cooked sucuk samples (Mean ± standard deviation)

Samples	Rare cooked	Medium cooked	Over cooked
S1	33.90 <sup>d</sup> ±1.70	33.80 <sup>cd</sup> ±1.50	37.00 <sup>e</sup> ±0.60
S2	53.61 <sup>b</sup> ±1.81	32.92 <sup>d</sup> ±1.33	40.31 <sup>b</sup> ±0.60
S3	24.60 <sup>f</sup> ±0.80	41.00 <sup>a</sup> ±1.90	33.10 <sup>d</sup> ±1.90
S4	31.63 <sup>e</sup> ±2.14	34.00 <sup>cd</sup> ±2.10	37.12 <sup>e</sup> ±0.70
S5	53.10 <sup>b</sup> ±1.00	41.80 <sup>a</sup> ±1.50	26.60 <sup>g</sup> ±0.60
S6	37.40 <sup>c</sup> ±0.60	24.50 <sup>f</sup> ±3.44	51.90 <sup>a</sup> ±3.30
S7	57.60 <sup>a</sup> ±1.40	38.30 <sup>b</sup> ±0.40	29.50 <sup>e</sup> ±0.80
S8	19.00 <sup>g</sup> ±1.30	23.90 <sup>f</sup> ±1.70	27.90 <sup>e</sup> ±0.90
S9	36.34 <sup>c</sup> ± 3.92	29.00 <sup>e</sup> ±0.60	24.40 <sup>f</sup> ±2.50
S10	22.90 <sup>f</sup> ±1.50	36.40 <sup>bc</sup> ±1.74	53.20 <sup>a</sup> ±1.13

<sup>a</sup> Different matching letters in the same column mean significant differences between the samples according to Duncan test (P < 0.05), All the analyses were performed triplicate

Canlı [35] determined total HCA content, moisture content and soluble protein content of 10 beef meatball samples. According to Pearson correlation test, positive correlation was obtained between moisture content and MeIQx content; norharman content; PhIP content of meatball samples (P<0.01). Positive correlation was obtained between soluble protein content and PhIP content of meatball samples (P<0.01). Correlations between chemical characteristics and heterocyclic amines were given in Table 5.

Choi et al. [36] determined soluble protein content of dried pork products. Total soluble protein content of low, medium, high protein containing samples were determined as 204.92 mg/kg, 184.43 mg/kg, and 142.33 mg/kg, respectively. Canlı [35] found soluble protein content of beef meatball between 1.28 mg/kg and 7.94 mg/kg; beef döner between 2.85 mg/kg and 8.33 mg/kg. Total soluble protein content of sucuk samples were higher than the literature values. Sucuk is a fermented product therefore; this could affect total soluble protein content of product.

Table 5. Correlations between chemical characteristics and individual and total heterocyclic aromatic amine content of sucuk

	Moisture content	Crude fat content	pH	Crude protein content	Ash content	Total HCA 1	Total HCA 2	Total HCA 3
IQ (1)	▲	■	Δ	Δ	Δ	▲	Δ	Δ
4,8-DiMeIQx (1)	▲	■	Δ	Δ	Δ	▲	Δ	Δ
Norharman (1)	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	▲	Δ	Δ
Total HCA (1)	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	▲	Δ	Δ
IQ (2)	▲	■	Δ	Δ	Δ	Δ	▲	Δ
4,8-DiMeIQx (2)	▲	■	Δ	Δ	Δ	Δ	▲	Δ
Norharman (2)	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	▲	Δ
Total HCA (2)	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	▲	Δ
IQ (3)	▲	■	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	▲
4,8-DiMeIQx (3)	▲	■	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	▲
Norharman (3)	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	▲
Total HCA (3)	Δ	Δ	▲	Δ	Δ	Δ	Δ	▲

▲ means significant positive correlation, ■ means significant negative correlation, Δ means no significant correlation. (1) means rare cooked, (2) means medium cooked (3)over cooked. Correlations were determined by Pearson correlation test at P<0.05 level

**CONCLUSION**

We have studied the formation and detection of HCAs in pan-fried sucuk. Norharman, which was the most

abundant HCA in sucuk, was detected up to 10.54 ng/g in over-cooked sucuk samples, followed by PhIP with a concentration up to 9.75 ng/g, then 4,8-DiMeIQx up to 5.98 ng/g, and lastly IQ up to 3.84 ng/g. Total HCA

content of sucuk samples were found between 1.52 ng/g and 17.89 ng/g. HCA was quantified in most of the analyzed sucuk samples. Over-cooked sucuk samples had the maximum total HCA concentration, whereas rare-cooked ones had the lowest.

## REFERENCES

- [1] Klassen, R.D., Lewis, D., Lau, B.P.Y., Sen, N.P. (2002). Heterocyclic aromatic amines in cooked hamburgers and chicken obtained from local fast food outlets in the Ottawa region. *Food Research International*, 35, 837-847.
- [2] Oz, F., Kaban, G., Kaya, M. (2007). Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species of trout. *Food Chemistry*, 10, 67-72.
- [3] Sanz Alaejos, M., Ayala, J.H., Gonzalez, V., Afonso, A.M. (2008). Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 862, 15-42.
- [4] Knize, M.G., Dolbeare, F.A., Carroll, K.L., Moore, D.H., Felton, J.S. (1994). Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 595-603.
- [5] Augustsson, K., Skog, K., Jägerstad, M., Dickman, P.W., Steineck, G. (1999). Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet*, 353, 703-707.
- [6] Skog K., Johansson, M., Jae Gerstad, M. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 879-896.
- [7] Oz, F., Kaya, M. (2001a). Heterocyclic aromatic amines in meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35, 739-753.
- [8] Oz, F., Kaya, M. (2001b). The inhibitory effect of black pepper on formation of heterocyclic aromatic amines in high-fat meatball. *Food Control*, 22, 596-600.
- [9] Skog, K. (2004). Blue Cotton, Blue Rayon and Blue Chitin in the analysis of heterocyclic aromatic amines- A review. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802, 39-44.
- [10] Haskaraca, G., Demirok, E., Kolsarici, N., Oz, F., Ozsarac, N. (2014). Effect of green tea extract and microwave pre-cooking on the formation of heterocyclic aromatic amines in fried chicken meat products. *Food Research International*, 63, 373-381.
- [11] Cross, A.J., Sinha, R. (2004). Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 44, 44-55.
- [12] Rohrmann, S., Hermann, S., Linseisen, J. (2009). Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: finding from a prospective European cohort study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89, 1418-1424.
- [13] Turesky, R.J., Taylor, J., Schnackenberg, L., Freeman, J.P., Holland, R.D. (2015). Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2348-3258.
- [14] Bozkurt, H., Erkmén, O. (2002). Effects of starter cultures and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). *Meat Science*, 61 (2), 149-156.
- [15] Turkish Food Codex (2019). Meat, prepared meat mixtures and meat products legislation, Legislation Number: 2018/52, 29 January 2019, Number: 30670.
- [16] Unal, K., Karakaya, M., Oz, F. (2018). The effects of different spices and fat types on the formation of heterocyclic aromatic amines in barbecued sucuk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 719-725.
- [17] Özdestand, Ö., Kaçar, E., Keskekoglu, H., Uren, A. (2014). Development of a new extraction method for heterocyclic aromatic amines determination in cooked meatballs. *Food Analytical Methods*, 7(1), 116-126.
- [18] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [19] Anon. (2001). Meat and Meat Products-Moisture content analysis, TS 1743 ISO 1442, Turkish Standards Institute Ankara, 1-6 p.
- [20] AOAC. (1990). Official Methods for Analysis, 15th ed. (Vol II), Association of Official Analytical Chemists Arlington, VA.
- [21] Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- [22] AOAC. (2000). 990.03.2000, Official Methods for Analysis, Association of Official Analytical Chemists USA.
- [23] Bilge, G. (2010). Effects of temperature and starter culture on formation of microbiological and biochemical changes in sucuk production, Master Thesis, Ankara University, Graduate School of Natural and Applied Sciences 118 p.
- [24] Balogh, Z., Gray, J.I., Gomaa, E.A., Booren, A.M. (2000). Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 395-401.
- [25] Britt, C., Gomaa, E.A., Gray, J.I., Booren, A.M. (1998). Influence of cherry tissue on lipid oxidation and heterocyclic aromatic amine formation in ground beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4891-4897.
- [26] Johansson, M.A.E., Fredholm, L., Bjerne, I., Jägerstad, M. (1995). Influence of frying fat on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers and pan residues. *Food and Chemical Toxicology*, 33 (12), 993-1004.
- [27] Busquets, R., Bordas, M., Toribio, F., Puignou, L., Galceran, M.T. (2004). Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the

- Spanish diet. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 802, 79-86.
- [28] Turesky, R.J., Bur, H., Huynh-Ba, T., Aeschbacher, H.U., Milon, H. (1988). Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked beef products by high performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 26 (6), 501-509.
- [29] Shin, H.S., Park, H., Park, D. (2003). Influence of different oligosaccharides and inulin on heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried ground beef patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6726-6730.
- [30] Ahn, J., Grun, I.U. (2005). Heterocyclic amines: 2. Inhibitory effects of natural extracts on the formation of polar and nonpolar heterocyclic amines in cooked beef. *Food and Chemical Toxicology*, 70(4), 263-268.
- [31] Keskekoglu, H., Uren, A. (2013). Inhibitory effects of pomegranate seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs after being cooked by four different methods. *Meat Science*, 96(4), 1446-1451.
- [32] Keskekoglu, H., Uren, A. (2017). Inhibitory effects of grape seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs cooked by four different techniques. *International Journal of Food Properties*, 20(1), 722-734.
- [33] Murkovic, M., Steinberger, D., Pfannhauser, W. (1998). Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *International Journal of Food Research and Technology*, 207, 477-480.
- [34] Szerk, A. (2015). Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: The influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAAs content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 39-46.
- [35] Canlı, E. (2012). Investigation of heterocyclic amine content of high temperature cooked some traditional foods. Master Thesis. Ege University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, İzmir, Turkey, 73p.
- [36] Choi, Y.M., Lee, S.H., Choe, J.H., Rhee, M.S., Lee, S.K., Joo, S.T., Kim, B.C. (2010). Protein solubility is related to myosin isoforms, muscle fiber types, meat quality traits, and postmortem protein changes in Porcine *Longissimus dorsi* muscle. *Livestock Science*, 127(2-3), 183-191.
- 
-

## Effect of Collection Period and Irrigation Process on Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of Olive Leaves

Nurhan Uslu  ✉, Mehmet Musa Özcan 

Food Engineering Department, Faculty of Agriculture, Selçuk University, Konya, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 13.09.2021, Accepted (Kabul Tarihi): 14.05.2022

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): [nurhanuslu@selcuk.edu.tr](mailto:nurhanuslu@selcuk.edu.tr) (N. Uslu)

☎ +90332 223 2876 📠 +90332 241 0108

### ABSTRACT

Olive leaves have drawn attention because of their contents of bioactive compounds that exhibit antioxidant activity. The aim of this study was to investigate the impact of irrigation on the phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaves belonged to different varieties collected between September and December in irrigated and rainfed orchards. Principal components analysis (PCA) was used to explain the effect of variables. The highest total phenolic content was determined in irrigated Ayvalık leaves (1945 mg/100g). Results showed that olive leaves contained significant amounts of flavonoids, ranging from 6379 to 159046 mg/100g. However, differences in antioxidant activity were generally between 1 and 2% regarding irrigation, collection time, and variety. Luteolin-7-glucoside (273-1461 mg/100g) was the main phenolic compound of olive leaves, followed by verbascoside (399-1002 mg/100g). The influence of irrigation showed differences in the amounts of phenolic compounds among the cultivars.

**Keywords:** Irrigation, Collection time, Olive leaf, Variety, Phenolic compounds

### Zeytin Yapraklarının Antioksidan Aktivite ve Fenolik Bileşenleri Üzerine Sulama İşleminin ve Toplama Periyodunun Etkisi

#### ÖZ

Zeytin yaprakları, antioksidan aktiviteye sahip biyoaktif bileşenleri içermesinden dolayı dikkat çekmektedir. Bu çalışmada, sulanan ve sulanmayan bahçelerden Eylül-Aralık ayları arası toplanan farklı çeşitlere ait zeytin yapraklarının antioksidan aktiviteleri ve fenolik bileşenleri üzerine sulama işleminin etkisi araştırılmıştır. Değişkenlerin etkisini açıklamak için temel bileşenler analizi (PCA) kullanılmıştır. En yüksek toplam fenolik madde içeriği sulanan Ayvalık yapraklarında (1945 mg/100g) belirlenmiştir. Sonuçlar, zeytin yapraklarının 6379-159046 mg/100g arasında önemli miktarda flavonoid içerdiğini göstermiştir. Ancak çeşit, toplama zamanı ve sulama gibi faktörlere göre örneklerin antioksidan aktivitelerindeki farklılık genellikle %1-2 arasında bulunmuştur. Zeytin yapraklarının major fenolik bileşeni luteolin-7-glukozid (273-1461 mg/100g) bulunmuş ve bunu verbaskozid (399-1002 mg/100g) izlemiştir. Sulama işleminin fenolik bileşenlerin miktarı üzerine etkisi çeşitler arasında farklılık göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Sulama, Toplama zamanı, Zeytin yaprağı, Çeşit, Fenolik bileşikler

### INTRODUCTION

Olive (*Olea europaea* L.) is one of the oldest cultivated and drought-tolerant trees [1]. After pruning process, the

amounts of by-products such as twigs and leaves are annually about 25 kg/tree, which differ according to age of tree, culture and pruning applications [2]. Olive leaves are utilised for feeding animal and healing certain

diseases in traditional medicine from past to present [3]. In a study, published by Bouaziz et al. [4], it was informed that the extract of olive leaf can be added to improve the shelf life and stability of foods. Also, it was determined that olive leaf extract exhibited better antioxidant activity in comparison to both vitamins (C and E) and pure hydroxytyrosol [5]. Herbal teas and food supplements, which contain leaves or extract, are consumed throughout the world [6].

Phenolic compounds of olive by-products, especially olive leaf, has drawn increased attention in recent years [7]. Several factors as variety, origin, ripening degree cause significant differences in the phenolic composition of olive leaves [8-9]. Besides these factors, water stress is taken into consideration due to limit of the sustainable agriculture, and also affect the physicochemical characteristics of plant [10, 11]. The adaptation of olive leaves to water stress depends on changes in the leaf regarding morphological, anatomical and physiological properties [12, 13]. In olive trees, intense water loss is prevented by regulating tree transpiration through stomal closure in leaves [14]. However, the availability of water in the soil affects tree performance, including fruit development, fruit characteristics and oil quality. In addition, irrigation can directly influence yield factors as well as the vegetative growth [15]. Accordingly, the irrigation process of olive trees has been increasingly applied all around the world since the 1990s [16]. According to our knowledge, no studies about the effect

of irrigation on the phenolic compounds of olive leaves are available. In this study, the influences of primarily irrigation and also variety and harvest time on antioxidant activity and phenolic compounds of olive leaves were investigated.

## MATERIALS and METHODS

### Collection of Olives Leaves

Olive leaves belonged to Ayvalık, Çöpaşı, Gemlik and Yağlık varieties grown in irrigated (altitude: 280 m) and arid (altitude: 307 m) orchards in Mersin location were collected from each side of the three trees, and at 20 days intervals between September and December in 2018. Olive trees of different varieties were located in the same orchard. Samples were transferred to the laboratory in paper bags and they were dried at room temperature prior to analyses. The collection times of olive leaves were September 15th, October 6th, October 27th, November 17th, December 8th, and December 29th, respectively.

### Climatic Conditions

The average monthly humidity, temperature, and total monthly rainfall graphs of the location where the olives leaves were collected in 2018 are shown in Figure 1.

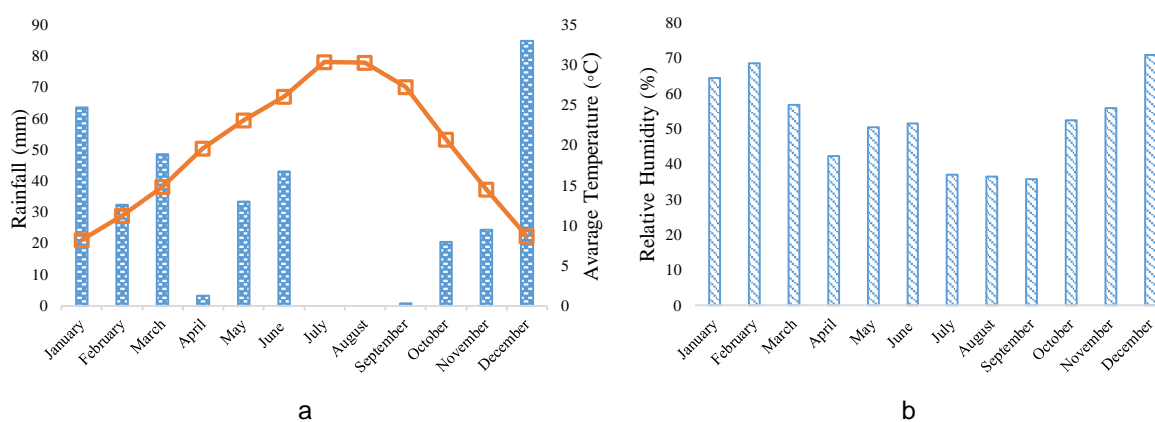


Figure 1. Average temperature, total rainfall (a) relative humidity (b) for the collection region of olive leaves in 2018

### Irrigation Process

Irrigation was carried out with a drip irrigation system which was applied once a month for a total of 4 hours. The total amount of irrigation water was 640 L/month. Irrigation process was applied till October.

### Methods

#### Moisture Content

Moisture amounts of olive leaves were determined by drying in an oven (Nüve FN055 Ankara, Turkey) at 105°C until a constant weight was obtained.

### Extraction Process

Olive leaves (0.5 g), which were ground into powder by a grinder, were mixed with 5 mL of methanol/water (80:20, v/v). The mixture was stirred for 1 min using vortex, followed by sonication in water bath for 10 min and centrifugated at 6000 rpm for 10 min. Supernatant was removed, and these steps were repeated twice. Finally, extract was filtered using a 0.45 µm syringe filter before analysis [17].

### Total Phenolic Content

Total phenol contents of olive leaf extracts were determined using Folin Ciocalteu (FC) reagent [18].

Extract (0.5 mL) was mixed with 2.5 mL of Folin Ciocalteu reagent and 1.5 mL of sodium carbonate solution (7.5%). The absorbance values of the samples, which were stored for 2 hours at room temperature and in the dark, were measured at 725 nm. Gallic acid was used as standard, and results were given in mg GAE/100g (fresh weight).

### Total Flavonoid Content

Total flavonoid contents of olive leaf extracts were determined spectrophotometrically according to the method of Hogan, et al. [19]. Extract (1 mL) was mixed with 0.3 mL of NaNO<sub>2</sub> (5%), 0.3 mL of AlCl<sub>3</sub> (10%) and 2 mL of NaOH (4%), respectively. The absorbance of mixture was recorded at 510 nm by a spectrophotometer. Results were given as mg catechin (CE)/ 100g of fresh weight.

### Antioxidant Activity (DPPH Free-radical Scavenging Activity)

The antioxidant activities of olive leaf extracts were determined using 2,2-diphenyl-1-picrazil (DPPH) according to method described by Lee, et al. [20]. The extracts (0.1 mL) were mixed with 2 mL of 0.1 mM DPPH solution and the absorbance values of the samples, which kept in the dark for 30 min at room temperature, were measured at 517 nm. Inhibition values (%) corresponding to each sample volume were calculated according to the equation given below.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = (A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) \times 100 / A_{\text{Control}}$$

(A: Absorbance)

### Determination of Phenolic Compounds

The phenolic compounds of olive leaf extracts were performed at 280 and 330 nm using HPLC.

Working conditions are presented below:

Instrument	Shimadzu LC 10A vp, Kyoto, Japan
Software	PC running Class VP chromatography manager software (Shimadzu, Japan)
Injection volume	40 µL
Column	Inertsil ODS3 analytical column (GL Sciences, Japan), (5 µm, 25 cm x 4.6 mm)
Mobile phase	A (2% formic acid aqueous solution), B (methanol)
Flow rate	0.85 mL / min
Detector	Shimadzu SPD-M20 A Diode Array Detector
Temperature	40°C

### Statistical Analysis

Statistical analyses of the results were performed by using SPSS-Statistics-22 statistical program. The means of significant variation sources were compared to Duncan Multiple Comparison Test with the help of MSTAT program. The significance level was given as

p<0.01 unless otherwise stated. The analyses were repeated three times (n =3). PCA was applied using XLSTAT software.

## RESULTS and DISCUSSION

Moisture contents of olive leaves ranged from 7.94% to 9.68% for Ayvalık variety; from 8.01% to 9.16% for Gemlik variety; from 7.78% to 8.92% for Yağlık variety; from 7.77% to 9.48% for Çöpaşı variety, as are shown in Table 1.

Total phenolic contents of Ayvalık, Gemlik, Yağlık and Çöpaşı olive leaves collected at different periods depending on irrigation and rainfed conditions are given in Table 2. Total phenolic contents of irrigated and rainfed Ayvalık, Gemlik, Yağlık and Çöpaşı leaves were determined between 1658.75 and 1945.00 mg/100g, 1418.75 and 1902.50 mg/100g, 1485.00 and 1903.75 mg/100g, 1685.00 and 1835.00 mg/100g, respectively. The highest total phenolic amount was found in both irrigated (1945.00 mg/100g) and rainfed (1910.00 mg/100g) Ayvalık olive leaves collected on December 29 (6th harvest). Collection time of leaves affected the total phenolic content, and the highest values were generally observed in 4th (November 17) or 6th (December 29) harvests. The reason of increase in total phenolic content was explained as the increase of polyphenol oxidase (PPO) content and activity in olive leaves. It was informed that the PPO in leaves contributed to the synthesis and modification of several compounds such as phenols during fruit development [21]. In addition, the effect of irrigation process showed differences regarding variety and collection time. For Gemlik leaves, irrigation process caused reduction, except 4th and 6th harvests, and the major decrease was detected in 3rd harvest (October 25). In leaves of Yağlık variety, there was no significant difference in total phenolic content for 1st, 2nd, and 4th harvests, while the highest reduction from 1768.75 mg/100g to 1485.00 mg/100g was observed in 3rd harvest when the leaves were irrigated. The total phenolic amounts of leaves belonged to Çöpaşı variety showed decrease in 2nd, 4th and 5th harvests or no change in 1st, 3rd, and 6th harvests. In Ayvalık leaves, the irrigation process caused a fluctuation in total phenolic contents during collection period. The main difference was determined in 2nd harvest, and total phenolic content of Ayvalık leaves increased from 1658.75 mg/100g to 1838.75 mg/100g with irrigation process. In previous study, Salah, et al. [22] informed that total phenolic contents of olive leaves belonged to different varieties were found between 73.05 mg GAE/g (Sevillane variety) and 144.19 mg GAE/g (Limouni variety). In another study, which were in accordance with current results, total phenolic contents of olive leaf extracts ranged from 13.23 mg GAE/g to 24.09 mg GAE/g [23]. Total phenolic contents of Chemlali (464.27 mg/100g) and Neb jmel (270.53 mg/100g) olive leaves collected in January were higher than leaves collected in October (219.85 mg/100g for Chemlali and 197.60 mg/100g for Neb jmel) [24].

Table 1. Moisture contents of olive leaves belonged to different varieties collected from irrigated and rainfed orchards during olive harvest period (%)<sup>1,2</sup>

Process	Variety	1st Harvest	2nd Harvest	3rd Harvest	4th Harvest	5th Harvest	6th Harvest
Irrigated	Ayvalık	8.25±0.06	8.51±0.13	8.98±0.67	8.84±0.66	8.67±0.29	9.59±0.25
	Gemlik	8.82±0.16	8.70±0.06	8.50±0.00	8.46±0.06	8.21±0.30	8.95±1.34
	Yağlık	8.00±0.47	7.99±0.22	8.52±0.68	8.19±0.33	8.92±0.70	8.48±0.67
	Çöpaşı	8.57±0.11	7.77±0.41	8.36±0.15	8.42±0.06	9.48±0.04	8.21±0.30
Rainfed	Ayvalık	8.79±1.08	8.78±0.08	8.44±0.03	7.94±0.08	8.13±0.23	9.68±0.25
	Gemlik	8.30±0.39	8.01±0.30	9.16±0.29	8.73±0.32	8.21±0.30	8.98±0.67
	Yağlık	8.83±0.31	7.78±0.57	8.46±0.64	7.98±0.03	8.42±0.76	8.23±0.33
	Çöpaşı	8.41±0.49	8.13±0.81	8.68±0.32	9.09±0.31	8.44±0.03	8.00±0.71

<sup>1</sup>mean ± standard deviation (n=3). <sup>2</sup>Average values were found statistically insignificant (p>0.05).

Table 2. Total phenolic contents of olive leaves belonged to different varieties collected from irrigated and rainfed orchards during olive harvest period (mg/100g)<sup>1,2</sup>

Process	Variety	1st Harvest	2nd Harvest	3rd Harvest	4th Harvest	5th Harvest	6th Harvest
Irrigated	Ayvalık	1718.75±7.01 <sup>ABCD</sup>	1838.75±5.53 <sup>AB</sup>	1745.00±6.97 <sup>ABCD</sup>	1792.50±4.25 <sup>ABC</sup>	1786.25±8.88 <sup>ABC</sup>	1945.00±5.28 <sup>A</sup>
	Gemlik	1662.50±7.39 <sup>BCDE</sup>	1538.75±7.99 <sup>CDEF</sup>	1418.75±9.24 <sup>F</sup>	1902.50±7.87 <sup>AB</sup>	1503.75±6.73 <sup>DEF</sup>	1786.25±4.95 <sup>ABC</sup>
	Yağlık	1845.00±6.93 <sup>AB</sup>	1807.50±6.64 <sup>AB</sup>	1485.00±6.91 <sup>EF</sup>	1873.75±5.33 <sup>AB</sup>	1761.25±6.20 <sup>ABC</sup>	1903.75±5.56 <sup>AB</sup>
	Çöpaşı	1835.00±6.97 <sup>AB</sup>	1745.00±4.42 <sup>ABCD</sup>	1705.00±5.68 <sup>ABCDE</sup>	1752.50±4.44 <sup>ABCD</sup>	1685.00±5.54 <sup>ABCD</sup>	1771.25±4.14 <sup>ABC</sup>
Rainfed	Ayvalık	1871.25±8.21 <sup>AB</sup>	1658.75±8.87 <sup>BCDE</sup>	1706.25±7.18 <sup>ABCDE</sup>	1818.75±5.22 <sup>AB</sup>	1886.25±4.47 <sup>AB</sup>	1910.00±7.30 <sup>AB</sup>
	Gemlik	1755.00±11.48 <sup>ABC</sup>	1751.25±9.92 <sup>ABCD</sup>	1741.25±8.27 <sup>ABCD</sup>	1846.25±5.21 <sup>AB</sup>	1781.25±6.15 <sup>ABC</sup>	1747.50±6.88 <sup>ABC</sup>
	Yağlık	1843.75±5.34 <sup>AB</sup>	1796.25±7.87 <sup>AB</sup>	1768.75±8.21 <sup>ABC</sup>	1876.25±7.39 <sup>AB</sup>	1671.25±4.10 <sup>BCDE</sup>	1777.50±9.51 <sup>ABC</sup>
	Çöpaşı	1822.50±8.76 <sup>AB</sup>	1822.50±7.49 <sup>AB</sup>	1698.75±6.96 <sup>ABCDE</sup>	1835.00±4.14 <sup>AB</sup>	1768.75±3.76 <sup>ABC</sup>	1791.25±4.42 <sup>ABC</sup>

<sup>1</sup>mean ± standard deviation (n=3). <sup>2</sup>The properties in the line of harvest applications (1st-6th harvests) were compared with Duncan test, and average values indicated with different letters between A and F were found statistically significant (p<0.01).

In Table 3, total flavonoid contents of leaves collected from Ayvalık, Gemlik, Yağlık and Çöpaşı varieties ranged between 58156.66 mg/100g and 159045.56 mg/100g, 6378.89 mg/100g and 118378.89 mg/100g, 37267.78 mg/100g and 134267.78 mg/100g, 34378.89 mg/100g and 132712.22 mg/100g, respectively. Olive leaves of irrigated Ayvalık variety collected on December 29 (6th harvest) had the highest total flavonoid content (159045.56 mg/100g), followed by rainfed Yağlık olive leaves (134267.78 mg/100g) picked at 4th harvest (November 17). Similar to the results of total phenolic content, there are notably differences in total flavonoid amounts regarding to variety and collection time. It could be seen that the maximum total flavonoid contents of Ayvalık, Gemlik and Çöpaşı olive leaves were found in both irrigated and rainfed samples picked on December 29. In Yağlık olive leaves, the highest total flavonoid content was determined in 5th harvest (113356.08 mg/100g) for irrigated samples; in 4th harvest (134267.78 mg/100g) for rainfed leaves. The increase in phenolic compounds of olive leaves could originate from L-phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity, which increases in cold [26]. Concerning the effect of irrigation, the major decrease from 103490.00 mg/100g to 6378.89 mg/100g was detected in Gemlik olive leaves collected on December 8 (5th harvest). For Ayvalık and Çöpaşı olive leaves when the influence of irrigation was evaluated, total flavonoid content fluctuated in regard to collection time. However, irrigation caused a reduction in both Gemlik (except 1st harvest) and Yağlık (except 5th and 6th harvests) olive leaves. A study of the olive leaves

belonged to different olive varieties indicated that total flavonoid amounts were found as 125.65 mg CE/g (Gerboua variety), 120.88 mg CE/g (Limouni variety), 94.03 mg CE/g (Chetoui), 82.74 mg CE/g (Chemlali), 56.75 mg CE/g (Sevillane), 97.74 mg CE/g (Lucques), 76.01 mg CE/g (Rosicola), and 91.32 mg CE/g (Meski) [22]. Abaza, et al. [23] reported that total flavonoid contents of olive leaf extracts varied from 11.78 mg CE/g to 21.47 mg CE/g. Total flavonoid content of Chemlali olive leaves (98.4 mg CE/100g) was lower than Neb jmel olive leaves (119.28 mg CE/100g) when collected in October, while Chemlali olive leaves (377.06 mg CE/100g) had higher total flavonoid content than Neb jmel (147.96 mg CE/100g) when collected in January [24]. In another study, total flavonoid contents of irrigated and rainfed olive leaves were reported as 53.94-92.14 mg QE/g for Kilis Yağlık variety and 58.13-89.79 mg QE/g for Gemlik variety; 54.79-89.74 mg QE/g for Kilis Yağlık variety and 34.53-88.01 mg QE/g for Gemlik variety, respectively [25]. Moreover, similar to current results, total flavonoid contents were higher than total phenolic contents in olive leaves (422.9 mmol RE/kg and 353.6 mmol GAE/kg) studied by Lama-Muñoz, et al. [27]; in leaves of *Timonius celebicus* (721.39 mg QE/g and 258.76 mg GAE/g), *Psychotria celebica* (288.91 mg QE/g and 157.40 mg GAE/g), and *Gardenia mutabilis* 426.82 mg QE/g and 89.486 mg GAE/g) reported by Pratiwi, et al [28].



Table 3. Total flavonoid contents of olive leaves belonged to different varieties collected from irrigated and rainfed orchards during olive harvest period (mg/100g) <sup>1,2</sup>

Process	Variety	1st Harvest	2nd Harvest	3rd Harvest	4th Harvest	5th Harvest	6th Harvest
Irrigated	Ayvalık	91712.22±59.46 <sup>B-L</sup>	100934.44±44.88 <sup>B-L</sup>	66045.56±50.75 <sup>I-Q</sup>	65490.00±52.44 <sup>J-Q</sup>	63378.89±79.57 <sup>K-Q</sup>	159045.56±76.15 <sup>A</sup>
	Gemlik	42156.66±26.33 <sup>M-R</sup>	23490.00±15.00 <sup>Q-R</sup>	14045.55±16.44 <sup>R</sup>	61712.22±58.15 <sup>K-Q</sup>	6378.89±18.59 <sup>R</sup>	87823.33±44.58 <sup>D-L</sup>
	Yağlık	102712.22±61.92 <sup>B-K</sup>	63601.11±46.80 <sup>K-Q</sup>	88601.11±31.20 <sup>C-L</sup>	110823.33±76.28 <sup>B-I</sup>	113356.08±67.63 <sup>B-H</sup>	110045.56±51.64 <sup>B-J</sup>
	Çöpaşı	105267.78±42.01 <sup>B-K</sup>	39045.56±53.61 <sup>M-R</sup>	105490.00±57.66 <sup>B-K</sup>	117156.67±75.20 <sup>B-G</sup>	34378.89±29.71 <sup>O-R</sup>	132712.22±66.88 <sup>ABC</sup>
Rainfed	Ayvalık	58156.66±53.22 <sup>L-Q</sup>	80601.11±45.53 <sup>F-N</sup>	70045.56±28.06 <sup>H-P</sup>	92601.11±64.55 <sup>B-L</sup>	122601.11±86.26 <sup>A-F</sup>	126601.11±81.78 <sup>A-E</sup>
	Gemlik	30378.89±16.16 <sup>PQR</sup>	57045.56±37.11 <sup>L-Q</sup>	70934.44±24.64 <sup>H-P</sup>	106156.67±88.76 <sup>B-K</sup>	103490.00±61.89 <sup>B-K</sup>	118378.89±91.70 <sup>A-G</sup>
	Yağlık	108490.00±72.83 <sup>B-J</sup>	81378.89±66.92 <sup>F-M</sup>	109490.00±70.78 <sup>B-K</sup>	134267.78±90.44 <sup>AB</sup>	37267.78±38.31 <sup>N-R</sup>	82156.67±65.13 <sup>E-M</sup>
	Çöpaşı	95156.66±43.63 <sup>B-L</sup>	89712.22±54.39 <sup>B-L</sup>	77378.89±63.26 <sup>G-O</sup>	105378.89±84.19 <sup>B-K</sup>	87378.89±47.84 <sup>D-L</sup>	127156.67±66.67 <sup>A-D</sup>

<sup>1</sup>mean ± standard deviation (n=3). <sup>2</sup>The properties in the line of harvest applications (1st-6th harvests) were compared with Duncan test, and average values indicated with different letters between A and R were found statistically significant (p<0.01).

Table 4. Antioxidant activities of olive leaves belonged to different varieties collected from irrigated and rainfed orchards during olive harvest period (%) <sup>1,2</sup>

Process	Variety	1st Harvest	2nd Harvest	3rd Harvest	4th Harvest	5th Harvest	6th Harvest
Irrigated	Ayvalık	78.85±0.08 <sup>A-D</sup>	76.17±0.40 <sup>G</sup>	78.43±0.15 <sup>A-E</sup>	77.59±0.23 <sup>EF</sup>	78.17±0.45 <sup>A-F</sup>	79.17±0.23 <sup>A-E</sup>
	Gemlik	78.70±0.08 <sup>A-E</sup>	78.59±0.15 <sup>A-E</sup>	78.96±0.09 <sup>A-D</sup>	78.91±0.30 <sup>A-D</sup>	79.01±0.10 <sup>ABC</sup>	78.64±0.50 <sup>A-E</sup>
	Yağlık	78.01±0.24 <sup>A-F</sup>	73.86±0.17 <sup>H</sup>	78.28±0.15 <sup>A-F</sup>	77.96±0.32 <sup>A-F</sup>	78.70±0.08 <sup>A-E</sup>	78.17±0.24 <sup>A-F</sup>
	Çöpaşı	77.75±0.18 <sup>DEF</sup>	77.85±0.08 <sup>C-F</sup>	78.43±0.15 <sup>A-E</sup>	78.49±0.23 <sup>A-E</sup>	77.90±0.23 <sup>B-F</sup>	79.11±1.73 <sup>AB</sup>
Rainfed	Ayvalık	77.96±0.31 <sup>A-F</sup>	77.59±0.23 <sup>EF</sup>	76.12±0.50 <sup>G</sup>	78.59±0.42 <sup>A-E</sup>	79.06±0.27 <sup>ABC</sup>	78.80±0.39 <sup>A-E</sup>
	Gemlik	78.80±0.17 <sup>A-E</sup>	78.70±0.32 <sup>A-E</sup>	78.96±0.09 <sup>A-D</sup>	78.80±0.24 <sup>A-E</sup>	78.43±0.41 <sup>A-E</sup>	78.69±0.65 <sup>A-E</sup>
	Yağlık	78.96±0.17 <sup>A-D</sup>	78.01±0.39 <sup>A-F</sup>	78.80±0.32 <sup>A-E</sup>	78.70±0.08 <sup>A-E</sup>	78.48±0.41 <sup>A-E</sup>	78.75±0.28 <sup>A-E</sup>
	Çöpaşı	77.86±0.10 <sup>C-F</sup>	77.17±0.31 <sup>F</sup>	78.43±0.15 <sup>A-E</sup>	77.75±0.18 <sup>DEF</sup>	78.54±0.23 <sup>A-E</sup>	78.17±0.70 <sup>A-F</sup>

<sup>1</sup>mean ± standard deviation (n=3). <sup>2</sup>The properties in the line of harvest applications (1st-6th harvests) were compared with Duncan test, and average values indicated with different letters between A and G were found statistically significant (p<0.01).

Antioxidant activities of olive leaves belonged to different olive varieties are shown in Table 4. The antioxidant activity values ranged from 76.12% to 79.17% for Ayvalık leaves; from 78.43% to 79.01% for Gemlik leaves; from 73.86% to 78.96% for Yağlık leaves; from 77.17% to 79.11% for Çöpaşı leaves. Similar to total phenolic and flavonoid results, Ayvalık leaves exhibited the best antioxidant activity (79.17%) when collected on December 29 (6th harvest). The factors such as variety, collection time and irrigation process caused minor differences on antioxidant activity of olive leaves. The highest reduction in antioxidant activity when the irrigation was applied was observed in Yağlık olive leaves (from 78.01% to 73.86%) collected on October 6. The radical scavenging activities determined using DPPH of Arbequina, Sikitita and Picual olive leaves were reported as 7.2 µg/mL, 11.3 µg/mL and 12.3 µg/mL, respectively [17]. In another study, published by Brahmi, et al. [24], the olive leaves harvested in January showed higher antioxidant activity (98.2% for Chemlali and 97.5% for Neb jmel) than leaves collected in October (79.8% for Chemlali and 58.75% for Neb jmel).

The phenolic compounds of irrigated and rainfed olive leaves are illustrated in Figure 2. The hydroxytyrosol contents of Ayvalık, Gemlik, Yağlık and Çöpaşı olive leaves varied between 149.05 mg/100g and 361.05 mg/100g; 217.02 mg/100g and 427.59 mg/100g; 240.61 mg/100g and 522.77 mg/100g; 195.53 mg/100g and 525.29 mg/100g, respectively. Çöpaşı olive leaves contained the highest amount of hydroxytyrosol (525.96 mg/100g) collected in rainfed tree on September 15 (1st

harvest), followed by Yağlık olive leaves (522.77 mg/100g). The rainfed Yağlık and Çöpaşı olive leaves collected in early-season had higher hydroxytyrosol content than those in late-season leaves. Additionally, a decrease was observed in Yağlık olive leaves, while an increase was mostly determined in Ayvalık, Gemlik and Çöpaşı olive leaves with irrigation. In a previous study, the hydroxytyrosol content was found as 0.67 mg/100g in Neb jmel olive leaves collected in October; 0.74 mg/100g in the same variety collected in January [24]. Ghomari, et al. [29] revealed that olive leaves had 0.02 mg/g hydroxytyrosol contents obtained by maceration; 15.17 mg/g hydroxytyrosol contents obtained by sonication. The tyrosol amounts of olive leaves ranged from 134.49 mg/100g to 328.72 mg/100g for Ayvalık variety; from 166.34 mg/100g to 346.44 mg/100g for Gemlik variety; from 190.66 mg/100g to 305.30 mg/100g for Yağlık variety; from 158.71 mg/100g to 324.71 mg/100g for Çöpaşı variety. Irrigation process caused an increase in tyrosol concentration of olive leaves. Moreover, no regular increase or decrease was determined in tyrosol content during collection time. According to the study of Lorini, et al. [30], tyrosol contents of Arbequina, Manzanilla, and Picual olive leaves were recorded as 6.43 µg/g, 13.11 µg/g, and 10.82 µg/g in autumn; 7.40 µg/g, 9.94 µg/g, and 7.26 µg/g in winter; 9.20 µg/g, 12.20 µg/g, and 9.70 µg/g in spring; 4.55 µg/g, 7.99 µg/g, and 1.29 µg/g in summer, respectively, and these results were lower than current study. The highest caffeic acid contents of Ayvalık (185.93 mg/100g), Gemlik (183.20 mg/100g), Yağlık (191.91 mg/100g) and Çöpaşı (217.38 mg/100g) varieties were detected in irrigated leaves collected

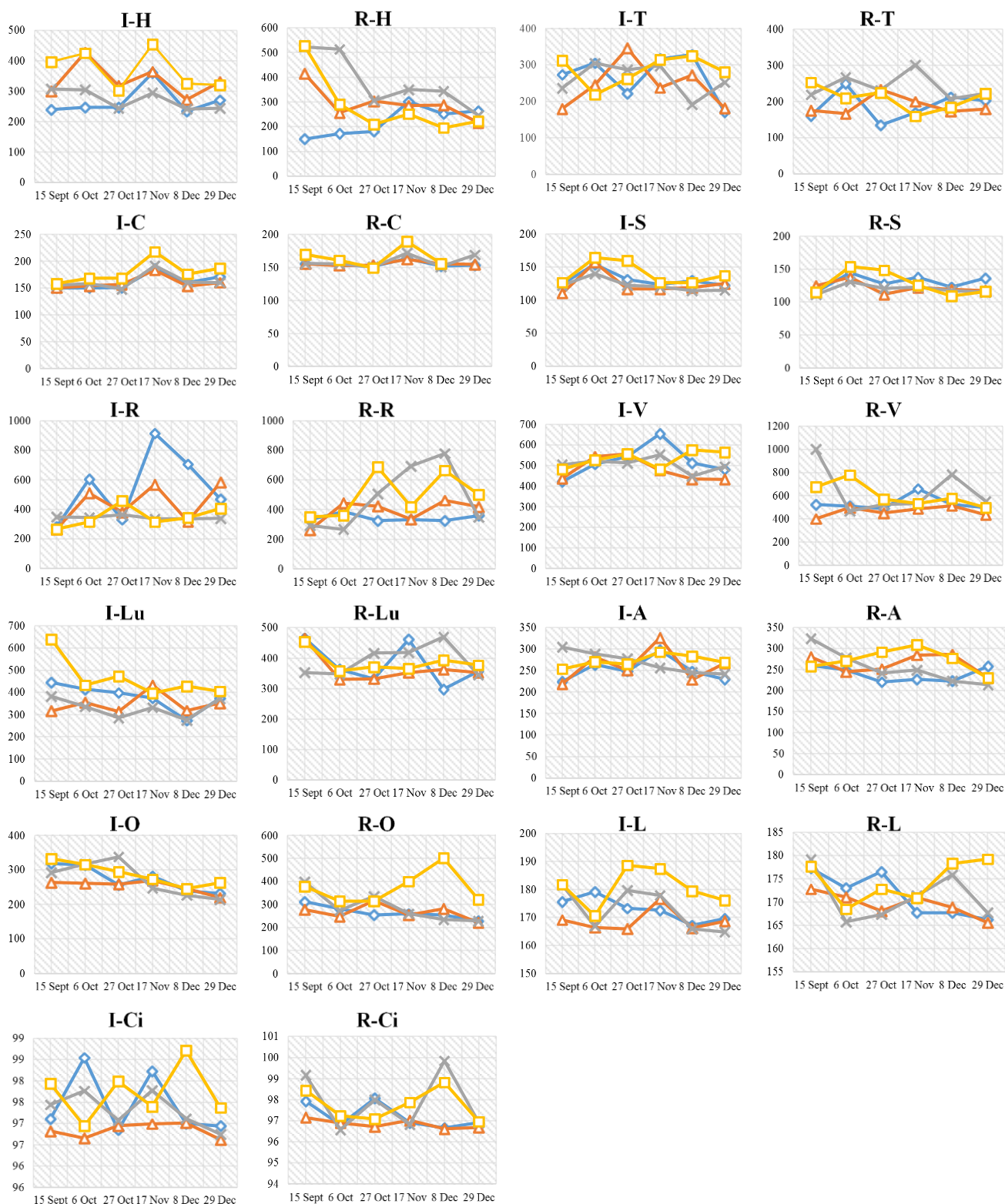


Figure 2. Phenolic compounds of olive leaves belonged to different varieties collected from irrigated and rainfed orchards during olive harvest period (mg/100g). ◇: Ayvalık, △: Gemlik, \* : Yağlık, □: Çöpaşı, I: Irrigated, R: Rainfed, H: Hydroxytyrosol, T: Tyrosol, C: Caffeic acid, S: Syringic acid, R: Rutin, V: Verbascoside, Lu: Luteolin-7-glucoside, A: Apigenin-7-glucoside, O: Oleuropein, L: Luteolin and Ci: cinnamic acid. Values are the average of 3 measurements (n=3).

November 17 (4th harvest), while the syringic acid amounts of Ayvalık (154.05 mg/100g), Gemlik (156.97 mg/100g), Yağlık (140.22 mg/100g) and Çöpaşı (164.64 mg/100g) olive leaves were found the maximum when collected from irrigated trees on October 6 (2nd harvest). For caffeic and syringic acid, there is no significant differences in regard to variety, collection time and irrigation process ( $p>0.05$ ). Pereira, et al. [31] informed that olive leaves contained 220.5 mg/kg caffeic acid. According to Medina, et al. [32], the commercial olive leaf extracts contained 0.04-0.10 g/kg caffeic acid. The rutin content of Ayvalık olive leaves (914.64 mg/100g) collected from irrigated trees on November 17 (4th harvest) was found higher than other varieties, followed by Yağlık olive leaves (780.18 mg/100g) picked from rainfed trees on December 8 (5th harvest). In Çöpaşı olive leaves, irrigation reduces the rutin amount during collection period. Additionally, the rutin content significantly increased from 331.71 mg/100g to 914.64 mg/100g in Ayvalık olive leaves and also decreased from 780.19 mg/100g to 333.64 mg/100g in Yağlık olive leaves because of irrigation process. The rutin contents of olive leaves were detected as 0.651 mg/kg for Arbequina variety; 0.319 mg/kg for Sikitita variety; 0.289 mg/kg for Picual variety in a study recorded by Talhaoui, et al. [17], while Pereira, et al. [31] determined the content of rutin as 495.9 mg/kg. The verbascoside concentrations of Ayvalık, Gemlik, Yağlık and Çöpaşı olive leaves varied between 420.24 mg/100g and 659.61 mg/100g; 399.09 mg/100g and 556.51 mg/100g; 446.69 mg/100g and 1001.94 mg/100g; 482.02 mg/100g and 777.23 mg/100g, respectively. It was observed that the richest leaves in terms of verbascoside content belonged to Yağlık variety and the highest amount of this hydroxycinnamic acid was found in leaves collected from rainfed trees on September 15. Moreover, irrigation process caused the reduction from 1001.94 mg/100g to 503.91 mg/100g in the same variety and collection time. Looking to similar studies in literature, the verbascoside contents of olive leaves were recorded as 1.127-4.069 mg/kg [17] and 966.1 mg/kg [31]. In another study, verbascoside contents of commercial olive leaves were determined between 0.36 and 2.31 g/kg [32]. The Ayvalık olive leaves contained the highest amount of luteolin-7-glucoside (1460.95 mg/100g), followed by Yağlık olive leaves (1345.08 mg/100g) when both of them were collected from rainfed trees. A significant reduction from 1460.95 mg/100g to 374.48 mg/100g for Ayvalık, and from 1345.08 mg/100g to 372.65 mg/100g for Yağlık olive leaves was detected with irrigation. Generally, the irrigation application increased the luteolin-7-glucoside contents of Çöpaşı olive leaves, while it was observed the opposite trend in Yağlık olive leaves during harvest period. In previous studies, luteolin-7-glucoside amounts of olive leaves were found as 0.94-4.65 g/kg [27]; 4208.9 mg/kg [31]; 8.27-819.32 mg/kg [33]. Apigenin-7-glucoside concentrations of Ayvalık, Gemlik, Yağlık and Çöpaşı olive leaves were determined as 220.52-297.22 mg/100g, 219.52-326.42 mg/100g, 214.20-323.81 mg/100g and 230.56-309.34 mg/100g, respectively. The apigenin-7-glucoside levels showed a minor differences according to collection time and irrigation process.

In an experiment carried out by Pereira, et al. [31], apigenin-7-glucoside amount of olive leaves was found as 2333.1 mg/kg. Moreover, a similar apigenin-7-glucoside content (2475.53 mg/kg) in olive leaf belonged to Zalmati Zarzis cultivar was identified by Ben Mohamed, et al. [33]. The highest oleuropein contents of Ayvalık, Gemlik, Yağlık and Çöpaşı olive leaves were detected as 317.53 mg/100g (1st harvest), 317.08 mg/100g (3rd harvest), 397.85 mg/100g (1st harvest), and 499.72 mg/100g (5th harvest), respectively. The oleuropein amounts of early-season leaves collected from irrigated trees were higher than late-season leaves. However, there is no regular increase or decrease in oleuropein levels of olive leaves picked from rainfed trees. The Çöpaşı olive leaves affected from irrigation process, especially in the last three harvest, and the maximum reduction from 499.72 mg/100g to 245.87 mg/100g was determined when collected on December 8. Similar oleuropein contents were obtained by Ben Mohamed, et al. [33] who dedected as 3146.06 mg/kg in Dokhar el Gorthab cultivar, and 4741.62 mg/kg in Fougi cultivar. Salah, et al. [22] determined the oleuropein contents between 30.76 mg/g and 57.24 mg/g. The oleuropein concentrations were found as 25.08 mg/100g in Neb jmel olive leaves collected in October; 19.93 mg/100g in the same variety collected in January [24]. In another study, oleuropein contents of dry olive leaves were recorded as 2.337 mg/kg for Arbequina variety; 2.110 mg/kg for Sikitita variety; 2.100 mg/kg for Picual variety [17]. The oleuropein content of olive leaves was reported as 26471.4 mg/kg by Pereira, et al. [31]. Luteolin contents of olive leaves varied from 166.30 mg/100g to 179.14 mg/100g for Ayvalık variety; from 165.63 mg/100g to 176.64 mg/100g for Gemlik leaves; from 164.83 mg/100g to 181.53 mg/100g for Yağlık samples; from 168.51 mg/100g to 188.55 mg/100g for Çöpaşı leaves, while cinnamic acid contents of olive leaves were determined between 96.58 mg/100g and 99.84 mg/100g. The collection time and irrigation did not significantly affect both luteolin and cinnamic acid contents of olive leaves. In a previous study, luteolin contents of Arbequina, Sikitita, and Picual varieties were recorded as 0.394 mg/kg, 0.367 mg/kg, and 0.497 mg/kg, respectively [17]. Ben Mohamed, et al. [33] reported that luteolin amounts of olive leaves of 21 studied genotypes varied between 1.79 mg/kg (Chemlali djerba) and 273.96 mg/kg (Zalmati zarzis). Olive leaves have been found to be rich in phenolic compounds and a comparison of their values with those in literature reveal differences. These differences can be attributed to growing temperature of plant, variety, ecological factors, collection period, maturation, soil structure, and analytical factors. Additionally, the structure or properties of the plant material and bioactive compounds may likely cause differences in the effects of the irrigation and collection period on phenolic compounds. Also, biochemical reactions and enzymatic activities in growing period of olive leaves depending on irrigation and dry agriculture applications can cause differences in phenolic compound types, and amounts. The varietal difference among plants can also be an important contributing factor for determining the phenolic profile. The presence of these important phenolic compounds having important biological activities show

the importance of leaves from different olive varieties for use in the development of functional and nutraceutical products.

### Principal Components Analysis of Bioactive Properties

Concerning eigenvalues, the first two components accounted for 36.24% of total variance (22.63% for PC1; 13.61% for PC2). Phenolic compounds, total phenolic and total flavonoid contents were placed in positive side of PC1, as is illustrated in Figure 3a. Antioxidant activity showed a negative correlation with PC1; positive correlation with PC2. Additionally, the samples of YR-1, ÇR-1, ÇI-1 and ÇI-4 were located in positive area of both PC1 and PC2. GI-1, GI-3, GI-2 and GI-5 samples were found in negative area of PC1 and PC2 (Figure 3b). It can be concluded that there was a positive correlation between all of the phenolic compounds and Çöpaşı leaves, while negative area of PC1 axis was correlated with Gemlik leaves (except GI-4).

Table 5. Eigenvalues and correlations between bioactive properties and principal components (PC1 and PC2)

	PC1	PC2
Eigenvalue	3.168	1.906
Variability (%)	22.630	13.612
Cumulative (%)	22.630	36.242
Correlations	PC1	PC2
Hydroxytyrosol	0.487	-0.113
Tyrosol	0.313	-0.373
Caffeic acid	0.437	0.350
Syringic acid	0.111	-0.358
Rutin	0.203	-0.089
Verbascoside	0.585	-0.112
Luteolin-7-glucoside	0.542	0.117
Apigenin-7-glucoside	0.601	-0.080
Oleuropein	0.601	-0.052
Luteolin	0.720	0.073
Cinnamic acid	0.755	-0.143
TPC	0.233	0.804
TFC	0.124	0.839
AA	-0.270	0.288

### CONCLUSION

Irrigation process is applied in several olive orchards on account of the fact that it causes positive differences in certain properties (such as fruit growing) of olives, although the olive tree is drought resistant. The effect of irrigation on the physicochemical properties and bioactive compounds of olives was reported in several studies. However, there is no study on the influence of irrigation on the phenolics of olive leaves, which are rich in bioactive compounds and are consumed as extracts or leaves. According to results obtained, not only variety and harvest time, but also irrigation significantly affected the total phenolic content, total flavonoid amounts, and

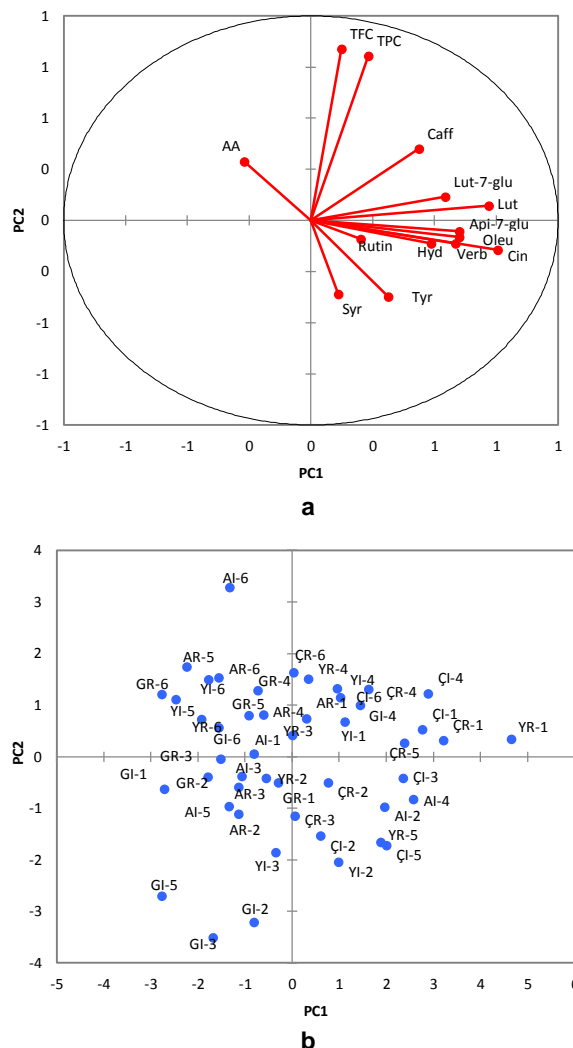


Figure 3. Principal components analysis (a: Loading plot, b: Score plot) of bioactive properties of olive leaves belonged to different varieties collected from irrigated and rainfed orchards during olive harvest period. AA: Antioxidant activity, TFC: Total flavonoid content, TPC: Total phenolic content, Caff: Caffeic acid, Lut-7-glu: Luteolin-7-glucoside, Lut: Luteolin, Api-7-glu: Apigenin-7-glucoside, Oleu: Oleuropein, Cin: Cinnamic acid, Verb: Verbascoside, Hyd: Hydroxytyrosol, Tyr: Tyrosol, Syr: Syringic acid, A: Ayvalık, G: Gemlik, Ç: Çöpaşı, Y: Yağlık, R: Rainfed, I: Irrigated.

antioxidant activities of olive leaves. In addition, the irrigation process increased the rutin and luteolin-7-glucoside contents of Çöpaşı leaves, and hydroxytyrosol amounts of Yağlık variety, while the reduction was observed in tyrosol and luteolin-7-glucoside contents of Yağlık leaves; hydroxytyrosol and oleuropein contents of Çöpaşı leaves, and tyrosol contents of Gemlik variety during the harvest period from September to December. In Ayvalık variety, the concentrations of phenolic compounds fluctuated regarding to collection time. In view of the results, responses of olive leaves to irrigation process showed differences according to variety during harvest period.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to TÜBİTAK 2237-A Scientific Education Activities for statistic training.

## CONFLICT OF INTEREST






The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this article.

## REFERENCES

- [1] Tubeileh, A., Bruggeman, A., Turkelboom, F. (2009). Effect of water harvesting on growth of young olive trees in degraded Syrian dryland. *Environment, Development and Sustainability*, 11(5), 1073-1090.
- [2] Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
- [3] Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M. (2015) Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*, 4(4), 682-698.
- [4] Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S. (2008). Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108(1), 253-262.
- [5] Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Río, J. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4), 457-462.
- [6] Tsimidou, M.Z., Papoti, V.T. (2010). Bioactive ingredients in olive leaves. In *Olives and olive oil in health and disease prevention*, Elsevier, 349-356 p.
- [7] Visioli, F., Poli, A., Gall, C. (2002). Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22(1), 65-75.
- [8] Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., Hammami, M. (2012). The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*, 38, 146-152.
- [9] Campeol, E., Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Cremonini, R., Ceccarini, L. (2003). Volatile fractions from three cultivars of *Olea europaea* L. collected in two different seasons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1994-1999.
- [10] Anjum, S., Saleem, M., Cheema, M., Bilal, M., Khaliq, T. (2012). An assessment to vulnerability, extent, characteristics and severity of drought hazard in Pakistan. *Pakistan Journal of Science*, 64(2), 138-143.
- [11] Lefèvre, I., Ziebel, J., Guignard, C., Hausman, J.F., Gutiérrez Rosales, R.O., Bonierbale, M., Hoffmann, L., Schafleitner, R., Evers, D. (2012). Drought impacts mineral contents in Andean potato cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198(3), 196-206.
- [12] Bacelar, E.A., Santos, D.L., Moutinho-Pereira, J.M., Gonçalves, B.C., Ferreira, H.F., Correia, C.M. (2006). Immediate responses and adaptive strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science*, 170(3), 596-605.
- [13] Ennajeh, M., Vadel, A.M., Khemira, H. (2009). Osmoregulation and osmoprotection in the leaf cells of two olive cultivars subjected to severe water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(4), 711-721.
- [14] Tognetti, R., d'Andria, R., Morelli, G., Alvino, A. (2005). The effect of deficit irrigation on seasonal variations of plant water use in *Olea europaea* L. *Plant and Soil*, 273(1-2), 139-155.
- [15] Caruso, G., Gucci, R., Sifola, M.I., Selvaggini, R., Urbani, S., Esposto, S., Taticchi, A., Servili, M. (2017). Irrigation and fruit canopy position modify oil quality of olive trees (cv. Frantoio). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11), 3530-3539.
- [16] Morales-Sillero, A., García, J., Torres-Ruiz, J.M., Montero, A., Sánchez-Ortiz, A., Fernández, J. (2013). Is the productive performance of olive trees under localized irrigation affected by leaving some roots in drying soil? *Agricultural Water Management*, 123, 79-92.
- [17] Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., Leon, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2014). Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 28-34.
- [18] Yoo, K.M., Lee, K.W., Park, J.B., Lee, H.J., Hwang, I.K. (2004). Variation in major antioxidants and total antioxidant activity of Yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) during maturation and between cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5907-5913.
- [19] Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoeklein, B., Zhou, K. (2009). Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. *LWT - Food Science and Technology*, 42(7), 1269-1274.
- [20] Lee, S.K., Mbwambo, Z., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E., Mehta, R., Kinghorn, A., Pezzuto, J. (1998). Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 1(1), 35-46.
- [21] Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M.Á., Peragón, J. (2008). Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening. *Tree Physiology*, 28(1), 45-54.
- [22] Salah, M.B., Abdelmelek, H., Abderraba, M. (2012). Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Medicinal Chemistry*, 2(5), 107-111.

- [23] Abaza, L., Talorete, T.P., Yamada, P., Kurita, Y., Zarrouk, M., Isoda, H. (2007). Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by a Tunisian Gerboui Olive Leaf Extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 1306-1312.
- [24] Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., Hammami, M. (2013). Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 49, 256-264.
- [25] Cetinkaya, H., Koc, M., Kulak, M. (2016). Monitoring of mineral and polyphenol content in olive leaves under drought conditions: Application chemometric techniques *Industrial Crops and Products*, 88, 78-84.
- [26] Hura, K., Rapacz, M., Hura, T., Żur, I., Filek, M. (2015). The effect of cold on the response of *Brassica napus callus* tissue to the secondary metabolites of *Leptosphaeria maculans*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2), 13.
- [27] Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*, 320, 126626.
- [28] Praptiwi, Sulistiarini, D., Qodrie, E.N.P., Sahroni, D. (2021). Antibacterial activity, antioxidant potential, total phenolic and flavonoids of three plant species of Rubiaceae from Banggai Island, Indonesia. *Biodiversitas*, 22 (5), 2773-2778.
- [29] Ghomari, O., Sounni, F., Massaoudi, Y., Ghanam, J., Kaitouni, L.B.D., Merzouki, M., Benlemlih, M. (2019). Phenolic profile (HPLC-UV) of olive leaves according to extraction procedure and assessment of antibacterial activity. *Biotechnology Reports*, 23, e00347.
- [30] Lorini, A., Aranha, B.C., Antunes, B.F., Otero, D.M., Jacques, A.C., Zambiasi, R.C. (2021). Metabolic profile of olive leaves of different cultivars and collection times. *Food Chemistry*, 345, 128758.
- [31] Pereira, A.P., Ferreira, I.C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.
- [32] Medina, E., Romero, C., Garcia, P., Brenes, M. (2019). Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food & Function*, 10, 4716-4724.
- [33] Ben Mohamed, M., Guasmi, F., Ben Ali, S., Radhouani, F., Faghim, J., Triki, T., Kammoun, N.G., Baffi, C., Lucini, L., Benincasa, C. (2018). The LC-MS/MS characterization of phenolic compounds in leaves allows classifying olive cultivars grown in South Tunisia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 78, 84-90.

## Presence of Rotavirus and Astrovirus in Employees, Tools and Equipment of Slaughterhouses and Meat Processing Plants

Halil Yalcin<sup>1</sup> , Mehmet Kale<sup>2</sup>  ✉, Oguz Gursoy<sup>3</sup> , Hasbi Sait Saltik<sup>2</sup> , Yusuf Yilmaz<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 15030, Burdur, Turkey

<sup>2</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, 15030, Burdur, Turkey

<sup>3</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Food Engineering, 15030, Burdur, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 22.01.2022, Accepted (Kabul Tarihi): 22.05.2022

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): drmkalex@yahoo.com (M. Kale)

☎ +90 248 213 20 50 📠 +90 248 213 20 01

### ABSTRACT

Rotavirus and astrovirus are two important foodborne pathogens for humans. This study was aimed to investigate the presence of viruses in four slaughterhouses. In the study, swab samples were obtained from both hands of sixty butchers working in slaughterhouses and different sections of meat processing plants and twenty-nine tools and equipment used in slaughterhouses to determine rotavirus and astrovirus antigens by ELISA. Personnel interviews were also held with the butchers to obtain information regarding their gender, age, education level, hygiene training, smoking status, habits of glove use during working as well as whether they had digestive problems in the period of study. Results of swab analyses indicated that rotavirus antigen was found in a butcher of a slaughterhouse. There was no rotavirus antigen in any tool and equipment used in slaughterhouses. Also, there was no astrovirus antigen in neither employee nor tool and equipment. Results showed that there was a risk of rotavirus contamination from personnel working in slaughterhouses where general hygiene rules were not fully implemented. It can be concluded that personal health consciousness and hygiene practices before and during working in a slaughterhouse are crucial for personnel protection against rotavirus or astrovirus infections.

**Keywords:** Astrovirus, Food, Rotavirus, Hygiene, Slaughterhouse

### Mezbahalar ve Et İşleme Tesislerinin Çalışanları ile Alet ve Ekipmanlarında Rotavirus ve Astrovirus Varlığı

#### ÖZ

Rotavirus ve astrovirus, insanlar için gıda kaynaklı iki önemli patojendir. Bu çalışmada, dört mezbahada rotavirus ve astrovirus varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; mezbahalarda kullanılan 29 alet ve ekipmanın yanı sıra mezbahalarda ve et işleme tesislerinin farklı bölümlerinde çalışan 60 kasabın elinden alınan sürüntü örneklerinde rotavirus ve astrovirus antijenlerinin varlığı ELISA yöntemi ile incelenmiştir. Ayrıca cinsiyet, yaş, eğitim durumu, hijyen eğitimi, sigara içme durumu, çalışırken eldiven kullanma alışkanlıkları ve çalışma döneminde sindirim sorunları yaşayıp yaşamadıkları hakkında bilgi almak için kasaplarla kişisel görüşmeler yapılmıştır. Swap analizlerinin sonucunda, bir mezbaha kasabında rotavirus antijeni tespit edilmiştir. Mezbahalarda kullanılan alet ve ekipmanlarda rotavirus antijeni bulunmamıştır. Ayrıca ne çalışanlarda ne de araç ve gereçlerde astrovirus antijeni tespit edilmemiştir. Sonuçlar, genel hijyen kurallarının tam olarak uygulanmadığı mezbahalarda çalışan personelden rotavirus kontaminasyonu riski olduğunu göstermiştir. Mezbahada çalışma öncesi ve sırasında kişisel sağlık

farkındalığının ve hijyen uygulamalarının, personelin rotavirus ve astrovirus enfeksiyonlarına karşı korunması açısından oldukça önemli olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Astrovirus, Gıda, Rotavirus, Hijyen, Mezbaha

## INTRODUCTION

Foodborne diseases caused by the contamination of foods with pathogens may occur at any stage during the food production, delivery and consumption chains, and may result from a variety of factors such as pollution in water, soil or air, unsafe food storage and processing conditions [1]. Noroviruses, rotaviruses, hepatitis A and E viruses and astroviruses have been reported as the major agents of foodborne diseases [2].

Rotaviruses, classified under the family of *Reoviridae*, are a genus of non-enveloped, segmented double-stranded RNA genome-containing viruses [3]. The fecal-oral route is the viral transmission of rotaviruses, and foodborne disease arises from the direct contact of processed and unprocessed foods with fecal material or due to poor hygiene of food handlers [2].

Astroviruses, non-enveloped positive-strand RNA viruses, have been previously isolated from human and animal species [4]. Human volunteer studies indicated that the transmission route for human astroviruses is the fecal-oral route [5]. Also, astroviruses are shown to be stable during vehicular transmission through drinking of fresh, marine waters and sewage [6, 7].

Diseases caused by foodborne pathogens such as bacteria, viruses, and parasites may influence human health and the local/global economy significantly. Recently, pathogenic factors in slaughterhouses for foodborne diseases have been studied extensively [8, 9]. Since contamination risk from foods, water, fomite,

environment, and wastes is always possible for these pathogens, studies, especially in enterprises producing raw meat, on these pathogens have become very important for human health [10]. A number of studies have been conducted on outbreaks related to water and food-borne rotavirus and astrovirus in the world [11-16].

The aim of this study was to determine the presence of rotavirus and astrovirus, which are important biological contaminants, on the tools, equipment and surfaces used by personnel at different stages of meat production and processing from slaughtering to packaging in various subunits of slaughterhouses.

## MATERIALS and METHODS

### Materials

In this study, swap samples were taken from private slaughterhouses in the cities of Burdur (n=3) and Istanbul (n=1) in Turkey. Swabs with sterile cotton containing 2 mL of phosphate buffer saline (Capricorn Scientific, PBS1A) were taken from both hands (palm, upper part and sides of fingers and fingernail tips) of personnel working in different sections of slaughterhouses (Table 1). Personnel interviews were also held with the employees of slaughterhouses to obtain information regarding their gender, age, education level, hygiene training, smoking status, habits of glove use during working as well as whether they had digestive problems (diarrhea, vomiting and abdominal pain) in the period of study.

Table 1. Distribution of sampling from slaughterhouse employees and different locations

Slaughterhouse	Number of swap samples from hands of employees (N)	Locations of sample collection in a slaughterhouse
Burdur-1	21	Storage, Cutting & Deboning, Packaging, Slaughterhouse, Offal
Burdur-2	4	Cutting & Deboning, Packaging
Burdur-3	14	Slaughterhouse, Offal
Istanbul	21	Slaughterhouse, Offal

In this study, sterile cotton swabs containing 2 mL PBS were taken from all surfaces of the tools and equipment in the working areas of slaughterhouses (Table 2). Sampling was done only in slaughterhouses in the city of Burdur.

### Rotavirus and Astrovirus ELISA Antigen Tests

Swabs taken from both hands (palm, upperparts and sides of fingers and fingernail tips) of employees working in different sections of slaughterhouses and PBS containing swabs taken from all surfaces of the

tools and equipment in the working areas of slaughterhouses were used in antigen tests. Qualitative ELISA tests of rotavirus antigen (R-biopharm, Ridascreen® Rotavirus, Germany) [17] and astrovirus antigen (R-biopharm, Ridascreen® Astrovirus, Germany) [18] were used in this study. Both tests were prepared by a sandwich-type method, which was originally designed for the detection of viral presence in fecal samples. Antigen tests were performed and evaluated according to the procedures supplied by their manufacturers.



Table 2. Sampling distribution of the tools and equipment used in slaughterhouses in Burdur, Turkey

Slaughterhouse	Name of tools or equipment	Number of tools or equipment (N)
Burdur-1	Knife	2
	Cutting board	2
	Packaging line	1
	Meat apron	2
	Hammer meat	1
Burdur-2	Knife	1
	Cutting board	3
	Meat apron	3
	Steel glove	1
	Chopper knife	1
	Handle of faucet	1
	Walls of warehouse	2
Burdur-3	Knife	2
	Cutting board	2
	Meat apron	4
	Saw	1

## RESULTS and DISCUSSION

Results of personnel interviews including the gender, age, educational and hygiene training status of personnel, their habits of glove use and smoking, and their symptoms of diarrhea, vomiting and abdominal pain in the different sections of slaughterhouses are given in Table 3. In this study, 86.7% (52/60) of all slaughterhouse personnel were male and 13.3% (8/60) were female. Their average age was between 33 and 38 years old. In terms of the education level of the

personnel participating in the study, the highest level was high school. All employees had previously received hygiene training. The use of gloves during working was complete with an exception for only one slaughterhouse (Burdur-1) (21.6%). The average smoking rate among employees was 20% in these enterprises. It was found that all employees did not have symptoms of diarrhea, vomiting and abdominal pain, except for a person, who was positive only for rotavirus, and showed the symptom of abdominal pain.

Table 3. Demographic information of employees and their interview results in different slaughterhouses

Slaughterhouse	Gender		Age Mean	Education Level*			Hygiene Training		Habits of Glove Wearing		Smoking Status		Diarrhea		Vomiting		Abdominal Pain	
	♂	♀		E	M	H	Y**	N	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N
	Burdur-1	21	-	37.2	10	9	2	21	-	8	13	19	2	-	21	-	21	1
Burdur-2	3	1	38.0	2	-	2	4	-	4	-	1	3	-	4	-	4	-	4
Burdur-3	14	-	33.0	9	2	3	14	-	14	-	10	4	-	14	-	14	-	14
Istanbul	14	7	36.2	12	7	2	21	-	21	-	18	3	-	21	-	21	-	21

\*E: Elementary school, M: Middle school, H: High school

\*\*Y: Yes, N: No

It has been reported that viral agents such as Hepatitis A virus, Adenovirus, Astrovirus, Hepatitis E virus, Enterovirus, foot and mouth disease virus, Norovirus, Rabic virus and Rotavirus pose a risk, as well as bacterial and parasitic agents during the stages of meat slaughtering, processing and consumption [19]. The presence of rotavirus has been previously determined in meat products such as minced meat, meatballs and sausages prepared from beef and dairy products such as milk, ice cream and cheese consumed in the different regions of Egypt [20]. It has been stated that Rotaviruses and Astroviruses are zoonotic in their nature and that they are transmitted from person to person or food via fecal-oral route through the hands of people [21, 22]. Food-borne Astrovirus, Rotavirus and Sapovirus infections have been previously reported to provide less than 1% transmission by Scallan et al. [23], and as a matter of fact, the results of the present study

were found to support their conclusion. In this study, among the samples taken from both hands of the workers in different parts of the slaughterhouse of Burdur-1, rotavirus antigen positivity was detected only in a male employee with smoking and glove-wearing habits, a high school degree, and abdominal pain symptoms. This person was astrovirus antigen negative. Apart from this employee, rotavirus and astrovirus antigens were found negative in workers of other slaughterhouses. In addition, rotavirus and astrovirus antigens were found negative in samples taken from tools and equipment in the working areas of all slaughterhouses.

There are different types of viruses causing gastroenteritis. These are usually rotavirus, Norwalk group viruses, astrovirus and adenoviruses. Several symptoms such as malaise, abdominal pain, pyrexia,

diarrhea and vomiting may occur in viral gastroenteritis. A particular hazard may present when prepared foods are laid out since the virus can be disseminated over a wide area in the form of aerosol droplets. These viruses are usually transmitted via the fecal-oral route by contaminated foods and waters [24].

Rotaviruses can replicate in mature epithelial cells at the tips of the villi in small intestines. Virus replication is rapid and reaches its peak within a short period [25]. Following virus replication, mature particles are released from cells by lysis. The vehicles of viral transmission include food, water, and person-to-person. It is estimated that only 1% of rotavirus cases may be foodborne [26]. ELISA is widely used in the diagnosis of rotavirus and is a reliable and inexpensive test [27]. It has been stated that it may give positive results in a load of at least  $10^4$ - $10^7$  virions and give false positivity between 3-5% [28].

The capsid proteins of human and turkey astroviruses may act like an enterotoxin and induce intestinal epithelial barrier dysfunction according to studies on *in vitro* and animal models, respectively [29]. Astrovirus can be recovered in the feces of asymptomatic children [30] and mammals [31], and this may reflect astroviruses prolonged shedding or nucleic acid persistence, or astrovirus virions can endure in the gastrointestinal tract, and be part of the gut virome. Factors influencing a persistent infection need to be explored, as well as those that can trigger an increase in viral replication or a recurrent pathogenic infection, since this can possibly lead to severe local or disseminated infection [32]. Astroviruses and other enteric viruses are spread by the fecal-to-oral route. Majority of illnesses from hepatitis A, rotavirus and astroviruses are a result from water and person-to-person transmissions [24].

Rotavirus antigen positivity was detected only in a male employee with smoking and glove-wearing habits, high school degree, and abdominal pain symptoms in the slaughterhouse of Burdur-1, and this person was astrovirus antigen negative. Interestingly, in the Burdur-1 slaughterhouse, rotavirus or astrovirus was not detected in the hands of employees who had a habit of glove use while working. This result could be either because other employees were not infected or their viral load ( $10^4$ - $10^7$  virion load) was not at a level to be detected in the ELISA test. Rotavirus infections are common in children under 5 years of age. Diarrhea is usually observed in around 25% of infections according to hospital records of developing countries [33]. General clinical symptoms in rotavirus infections in all age groups include fever, vomiting and non-bloody diarrhea for 2-3 days [25]. In a rotavirus epidemic that occurred in college students; diarrhea, abdominal pain, loss of appetite, nausea and fatigue, vomiting, headache, chills, low fever and myalgia symptoms were observed [34]. Symptoms of rotavirus infections in adults can be seen in a wide spectrum. While some studies [35] reported that abdominal pain symptoms could be observed together with other symptoms, there were also results of experimental studies in which no symptoms were observed [36]. The most effective way of protection from

rotavirus infections is to prevent fecal-oral transmission. For this, direct contact with the infected person should be minimized, and contaminated food and water should be avoided. Since 43% of rotavirus virions on human fingers can remain alive for 60 minutes, it has been stated that hand washing is critical in protection [37]. American Academy of Pediatrics [38] has emphasized that the use of gloves and gowns, isolation and careful hand washing practices are crucial in individual protection from rotavirus infection.

Meat and meat products usually lead to intense activities in slaughterhouses. The type of slaughtered animals differs between countries [39]. Generally, because of variations in practices used in slaughterhouses, there is a continuous need for facilities and equipment that assure a safe production of meat and meat products for human consumption besides the safety of the workers [40]. A slaughterhouse can have several contaminants. The accretion of pathogens is affected by how the animals are slaughtered, eviscerated, and stored, and the contamination risk for meat and meat production is high [41]. Rotavirus can stay alive under various environments such as low humidity level, room temperature and cold, and on smooth surfaces for a long time [42]. It is recommended to use hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and 70% ethanol solutions as disinfectants to prevent the spread of rotaviruses [38]. Widespread vaccination can be used for protection against rotavirus infection in children. On the other hand, although vaccine trials are conducted in adults, they may not be used for protection purposes. Vaccination becomes an option only for individuals who have a weak immune system, exhibit diarrhea symptoms and/or are about to travel to some countries [27].

## CONCLUSION

In this study, rotavirus and astrovirus antigens were found negative in samples taken from tools and equipment in the working areas of Burdur slaughterhouses. Particular attention was paid to cleanliness and hygiene rules in the sampling areas (ground, floor and cutting surfaces) and equipment used in these slaughterhouses. It was observed that the equipment and surfaces in slaughterhouses were heat-treated at a temperature of 70°C for 5 min, and cutting surfaces were made of either stainless steel or wood. In addition, it could be concluded that whether employees receive hygiene training or they generally use gloves during working could be effective in the protection of employees against rotavirus and astrovirus infections.

## REFERENCES

- [1] WHO. (2021). Food Borne Diseases. Available at: [https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1) (Accessed: 24 June 2021).
- [2] Atreya, C.D. (2004). Major foodborne illness causing viruses and current status of vaccines against the diseases. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1, 89-96.

- [3] Wilhelmi, I., Roman, E., Sánchez-Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 247-262.
- [4] Vu, D.L., Cordey, S., Brito, F., Kaiser, L. (2016). Novel human astroviruses: Novel human diseases? *Journal of Clinical Virology*, 82, 56-63.
- [5] Midthun, K., Greenberg, H.B., Kurtz, J.B., Gary, G.W., Lin, F.Y., Kapikian, A.Z. (1993). Characterization and seroepidemiology of a type 5 astrovirus associated with an outbreak of gastroenteritis in Marin County, California. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 955-962.
- [6] Bosch, A., Pinto, R.M., Villena, C., Abad, F.X. (1997). Persistence of human astrovirus in fresh and marine water. *Water Science and Technology*, 35, 243-247.
- [7] Pinto, R.M., Villena, C., Le Guyader, F., Guix, S., Caballero, S., Pommepuy, M., Bosch, A. (2001). Astrovirus detection in wastewater samples. *Water Science and Technology*, 43, 73-76.
- [8] Abebe, E., Gugsa, G., Ahmed, M. (2020). Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 1-19.
- [9] Fasanmi, O.G., Balogun, F.A., Makinde, G.E., Fasina, F.O. (2017). Review of microbial zoonoses in slaughterhouses and identified potential critical risk points along red meat processing chain in Nigeria. *CAB Reviews*, 12, 1-12.
- [10] Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3, 529-563.
- [11] Koroglu, M., Yakupogullari, Y., Otlu, B., Ozturk, S., Ozden, M., Ozer, A., Sener, K., Durmaz, R. (2011). A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *The New Microbiologica*, 34, 17-24.
- [12] El-Senousy, M., Guix, S., Abid, I., Pinto, R.M., Bosch, A. (2007). Removal of astrovirus from water and sewage treatment plants, evaluated by a competitive reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 164-167.
- [13] Espinosa, A.C., Mazari-Hiriart, M., Espinosa, R., Maruri-Avidal, L., Méndez, E., Arias, C.F. (2008). Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water. *Water Research*, 42, 2618-2628.
- [14] Yokoi, H., Kitahashi, T., Tanaka, T., Utagawa, E. (2001). Detection of astrovirus RNA from sewage works, seawater and native oysters samples in Chiba City, Japan using reverse transcription-polymerase chain reaction. *The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 75, 263-269.
- [15] Quiroz-Santiago, C., Vázquez-Salinas, C., Natividad-Bonifacio, I., Barrón-Romero, B.L., Quiñones-Ramírez, E.I. (2014). Rotavirus G2P4 detection in fresh vegetables and oysters in Mexico City. *Journal of Food Protection*, 77, 1953-1959.
- [16] Bagordo, F., Grassi, T., Idolo, A., Serio, F., Gabutti, G., De Donno, A. (2013). Rotavirus occurrence in shellfish with low levels of *E. coli*. *Food and Environmental Virology*, 5, 169-175.
- [17] R-biopharm, Ridascreen® Rotavirus, Germany. <https://clinical.r-biopharm.com/products/ridascreen-rotavirus/> (Accessed on 04 May 2022).
- [18] R-biopharm, Ridascreen® Astrovirus, Germany. <https://clinical.r-biopharm.com/products/ridascreen-astrovirus/> (Accessed on 04 May 2022).
- [19] Fosse, J., Seegers, H., Magras, C. (2008). Foodborne zoonoses due to meat: a quantitative approach for a comparative risk assessment applied to pig slaughtering in Europe. *Veterinary Research*, 39, 1-16.
- [20] Zaher, K.S., Ahmed, W.M., Syame, S.M., El-Hewairy, H M. (2008). Detection of health hazard-food born viruses in animal products anticipated for human consumption. *Global Veterinaria*, 2, 192-197.
- [21] Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Veterinary Microbiology*, 140, 246-255.
- [22] Smith, J.L., Fratamico, P.M. (2018). Emerging and re-emerging foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15, 737-757.
- [23] Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15.
- [24] Appleton, H. (2000). Control of food-borne viruses. *British Medical Bulletin*, 56, 172-183.
- [25] Desselberger, U., Gary J. (2009). Viral gastroenteritis. *Medicine*, 37, 594-598.
- [26] Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Disease*, 5, 607-625.
- [27] Anderson, E.J., Weber, S.G. (2004). Rotavirus infection in adults. *The Lancet Infectious Disease*, 4, 91-99.
- [28] Iturriza-Gomara, M., Green, J., Brown, D.W., Ramsay, M., Desselberger, U., Gray, J.J. (2000). Molecular epidemiology of human group A rotavirus infections in the United Kingdom between 1995 and 1998. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 4394-4401.
- [29] Moser, L.A., Carter, M., Schultz-Cherry, S. (2007). Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *Journal of Virology*, 81, 11937-11945.
- [30] Resque, H.R., Munford, V., Castilho, J.G., Schmich, H., Caruzo, T.A., Racz, M.L. (2007). Molecular characterization of astrovirus in stool samples from children in Sao Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 969-974.
- [31] Moser, L.A., Schultz-Cherry, S. (2005). Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunology*, 18, 4-10.
- [32] Wunderli, W., Meerbach, A., Gungor, T., Berger, C., Greiner, O., Caduff, R., Trkola, A., Bossart, W., Gerlach, D., Schibler, M., Cordey, S., McKee, T.A., Van Belle, S., Kaiser, L., Tapparel, C. (2012). Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS ONE*, 7, 101371.

- [33] Steele, A.D., Peenze, I., de Beer M.C., Pager, C.T., Yeats, J., Potgieter, N., Ramsaroop, U., Page, N.A., Mitchell, J.O., Geyer, A., Bos, P., Alexander, J.J. (2003). Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. *Vaccine*, 21, 354-360.
- [34] Fletcher, M., Levy, M.E. (2000). Foodborne outbreak of Group A rotavirus gastroenteritis among college students: District of Columbia, March–April 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49, 1131-1133.
- [35] Ward, R.L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R., Schiff, G.M. (1986). Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *Journal of Infectious Disease*, 154, 871-880.
- [36] Ward, R.L., Bernstein, D.I., Shukla, R., McNeal, M.M., Sherwood, J.R., Young, E.C., Schiff, G.M. (1990). Protection of adults rechallenged with a human rotavirus. *Journal of Infectious Disease*, 161, 440-445.
- [37] Ansari, S.A., Sattar, S.A., Springthorpe, V.S., Wells, G.A., Tostowaryk, W. (1988). Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1513-1518.
- [38] American Academy of Pediatrics (2003). *Infection Control for Hospitalized Children*. 1<sup>st</sup> Ed. In: Pickering, L.K., Red book: 2003 report of the Committee on Infectious Diseases. Elk Grove Village, IL, 150p.
- [39] Cook, E.A., de Glanville, W.A., Thomas, L.F., Kariuki, S., Bronsvort, B.M., Fevre, E.M. (2017). Working conditions and public health risks in slaughterhouses in western Kenya. *BMC Public Health*, 17, 14.
- [40] Ursachi, C.S., Munteau, F.D., Ciaco, G. (2021). The safety of slaughterhouse workers during the pandemic crisis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 2633.
- [41] Ciabrone, L., Gioffre, A., Musarella, R., Samele, P., Visaggio, D., Pirolo, M., Clausi, M.T., Di Natale, R., Gherardi, M., Spatari, G., Visca, P., Casalnuova, F. (2020). Presence of *Mycobacterium bovis* in slaughterhouses and risks for workers. *Preventive Veterinary Medicine*, 181, 105072.
- [42] Sattar, S.A., Lloyd-Evans, N., Springthorpe, V.S., Nair, R.C. (1986). Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: Potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *Journal of Hygiene*, 96, 277-289.
-

## Effect of Using Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Powder and Probiotic Bacteria on Probiotic Shelf Life and Quality Properties of Ice Cream

Engin Gündoğdu<sup>1</sup> , Hatice Ertem<sup>2</sup> , Songül Çakmakçı<sup>2</sup>  

<sup>1</sup>Gümüşhane University, Department of Food Engineering, 29100 Gümüşhane, Turkey

<sup>2</sup>Atatürk University, Department of Food Engineering, 25240 Erzurum, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 09.12.2021, Accepted (Kabul Tarihi): 18.06.2022

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): [cakmakci@atauni.edu.tr](mailto:cakmakci@atauni.edu.tr) (S. Çakmakçı)

☎ +90 442 231 24 91 📠 +90 442 231 58 78

### ABSTRACT

In this study, the effect of green tea powder (GTP) in ice cream production on the ice cream properties and viability of probiotic bacteria [*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (*Bifidobacterium* BB-12) (P)] was investigated. Four ice cream groups (Control, C: without GTP and P; Probiotic Control (PC): with P; P+1% GTP; P+3% GTP samples) were produced. *Bifidobacterium* BB-12 (P) was added at 10<sup>8</sup> cfu/mL. pH, overrun, color, first dripping time, complete melting time and sensory properties were carried out on the second day. P was counted at 2, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days of storage. *Bifidobacterium* BB-12 number of PC was 6.54 log cfu/g at the 90<sup>th</sup> day. *Bifidobacterium* BB-12 number of PC was 7.10 log cfu/g, P+1% GTP sample was 6.48 log cfu/g and P+3% GTP sample was 5.84 log cfu/g at the 75<sup>th</sup> day. *Bifidobacterium* BB-12 number of PC was 7.24 log cfu/g, P+1% GTP sample was 6.59 log cfu/g and P+3% GTP sample was 6.69 at the 60<sup>th</sup> day. Sensory properties and probiotic counts showed that P+1% GTP sample could be accepted as a probiotic ice cream until day 75. Hence, GTP could be successfully used as a functional ingredient in the production of probiotic ice cream.

**Keywords:** Ice cream, *Bifidobacterium* BB-12, Green tea powder, Shelf life, Functional food

### Yeşil Çay (*Camellia sinensis* L.) Pudrası ve Probiyotik Bakteri Kullanımının Dondurmanın Probiyotik Raf Ömrü ve Kalite Özelliklerine Etkisi

#### ÖZ

Bu çalışmada, dondurma üretiminde yeşil çay pudrası (YÇP) kullanımının probiyotik bakterinin (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium* BB-12) (P) canlılığı ve dondurma özelliklerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla dört çeşit dondurma örneği [(Kontrol: YÇP ve probiyotik bakteri içermeyen örnek; Probiyotik Kontrol (PK): probiyotik bakteri içeren örnek; probiyotik bakteri ve %1 YÇP içeren örnek (P+%1 YÇP); probiyotik bakteri ve %3 YÇP içeren örnek (P+%3 YÇP) üretilmiştir. Probiyotik grup örneklerin üretiminde 10<sup>8</sup> kob/mL *Bifidobacterium* BB-12 ilave edilmiştir. Örneklerde pH, hacim artışı, renk, ilk damlama süresi ve tam erime süresi ile duyuşal özellikler üretimin 2. gününde belirlenmiştir. Probiyotik bakteri sayısı depolamanın 2, 15, 30, 45, 60, 75 ve 90. günlerinde tespit edilmiştir. PK örneğinde 90. günde *Bifidobacterium* BB-12 sayısı 6.54 log kob/g olarak bulunmuştur. Probiyotik bakteri sayısı 75. günde PK kodlu örnekte 7.10 log kob/g, P+%1 YÇP kodlu örnekte 6.48 log kob/g ve P+%3 YÇP kodlu örnekte 5.84 log kob/g olarak saptanmıştır. Depolamanın 60. gününde ise PK kodlu örnekte 7.24 log kob/g, P+%1 YÇP kodlu örnekte 6.59 log kob/g ve P+%3 YÇP kodlu örnekte 6.69 log kob/g olarak bulunmuştur. Sonuç olarak; duyuşal özellikler ve probiyotik bakteri sayıları dikkate alındığında P+%1 YÇP kodlu örneğinin 75. güne kadar probiyotik raf ömrünü koruduğu ve yeşil çaylı probiyotik dondurma olarak kabul edilebileceğini göstermiştir. Bu nedenlerle, YÇP'nin probiyotik dondurma üretiminde fonksiyonel bir bileşen olarak başarıyla kullanılabileceği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Dondurma, *Bifidobacterium* BB-12, Yeşil çay pudrası, Raf ömrü, Fonksiyonel gıda

## INTRODUCTION

Consumer perceptions to foods are important in the development and marketing of products [1]. Because the relationship between nutrition and health has a huge impact on consumer's nutrition preference, this has led to the development of functional food concepts, which have positive health effects as well as nutritional value [2]. For this reason, consumers use foods containing natural antioxidants, dietary fibers, natural colorants, low calories, low fat and other natural additives. In addition, prebiotic or probiotic bacteria supplementation to ice cream provides functional properties and can increase the nutritional value and health benefits of ice cream [3]. Dairy products are in the appropriate composition for the survival of probiotics [4-6]. The viability of probiotic culture in the food product should be adequately high,  $10^6$ - $10^8$  cfu/mL or g during the shelf life [6-8]. During the production of ice cream, the viability of probiotic strains is significantly preserved. In particular, the effect of low-temperature storage and probiotic bacteria supplementation on flavor, texture and other sensory properties is very low [9]. Ice cream mix basically include fat, protein, sugar, stabilizers, and emulsifiers [10]. It can be supplemented with probiotics and other active components providing additional functional properties. So, nutritional enrichment of ice cream is an effective way to increase the perception of health [1] and adding green tea is thought to be a good way for producing a new kind of ice cream. Tea is used in green, oolong and black tea forms, obtained from the leaves of the *Camellia sinensis* L plant. Green tea is healthier because it is the least processed form. Green tea is very beneficial because of the phenolic compounds, especially catechins, which is powerful antioxidant effects and health benefits [11-14]. The nutritional significance of green tea is attributed to the phenolic compounds (30% dry weight). Green tea contains proteins (15-20% dry weight, dw), fiber (26% dw), carbohydrates (5-7% dw, such as cellulose, pectin, glucose, fructose, sucrose), lipids (7% dw), linoleic and  $\alpha$ -linolenic acids, minerals (5% dw, such as Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, etc.) and vitamins (such as B, C, E), chlorophyll and carotenoids, volatile compounds and etc. [11].

This study aim was to investigate the effect of green tea powder (GTP) supplementation on the viability of *Bifidobacterium* BB-12 added during the freezing process of ice cream. It was also to determine the physical and sensory properties of ice cream samples. In this way, the development of a new type of ice cream with natural antioxidant, natural green color and probiotic bacteria will be more nutritious and functional in addition to developing different ice cream formulations.

## MATERIALS and METHODS

### Materials

Whole cows' milk and cream were supplied from the Dairy Plant of Atatürk University (Erzurum, Turkey). Green tea (*C. sinensis*) powder (GTP) was purchased from Atatürk Tea and Horticultural Research Institute (Rize, Turkey). The particle size of GTP used as

supplement was less than  $355\mu\text{m}$ . The average dry matter (%), ash (%), protein (%) and pH of GTP were found, respectively, as follows: 95.47, 4.13, 21.50 and, 5.20. The GTP found in glass bottle was pasteurized in a water bath at  $65^\circ\text{C}$  for 30min and stored in the refrigerator ( $4^\circ\text{C}$ ) until use. After pasteurization, no coliform bacteria were detected in the GTP sample ( $<1$  log cfu/g). The freeze-dried lactic culture for Direct Vat Set (DVS) *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, *Bifidobacterium* BB-12 (NuTrish® BB-12®) (P) was obtained from Chr-Hansen (İstanbul, Turkey). Commercial sugar, stabilizer (salep) and emulsifier (mono glyceride) were supplied from a local market (Erzurum, Turkey) and skimmed milk powder by Pınar Dairy Products Co. (İzmir, Turkey).

### Ice Cream Mix Preparation and Production of Ice Cream Samples

Whole cow milk was divided into four equal parts of 4 kg each. The fat content of ice cream mix samples was adjusted to 5%. The dry matter ratio of milk was increased by the addition of nonfat milk powder. The content of sugar (15%), fat (5%), non-fat milk solids (11%), stabilizer (salep, 0.7%) and emulsifier (monoglyceride, 0.2%) were the same in all ice cream mixes. For all the parts mix preparation procedure and pasteurization were same. One part was control sample (C) (without GTP and P), the second one was probiotic control (PC) (containing only P), the third one was containing P and 1% GTP (P+GTP1 sample) and the fourth part was containing P and 3% GTP (P+GTP3 sample) (Figure 1). Mixes were frozen in the ice cream machinery ( $-5^\circ\text{C}$ ) (Ugur Co., Nazilli, Turkey). The cylinder capacity of the freezer was 6 L and 4 L mix was added to allow for overrun development. The whipping time was 15 min to get to  $-5^\circ\text{C}$ .

### Analyses

Physical, chemical, color and sensory analyses were done after two-day storage but probiotic bacteria evaluation was conducted for 90 days. The experimental procedure was duplicated.

### Physical and Chemical Analyses

For overrun (OR), A 100-mL cup was used and values were calculated using the following formula [15]:

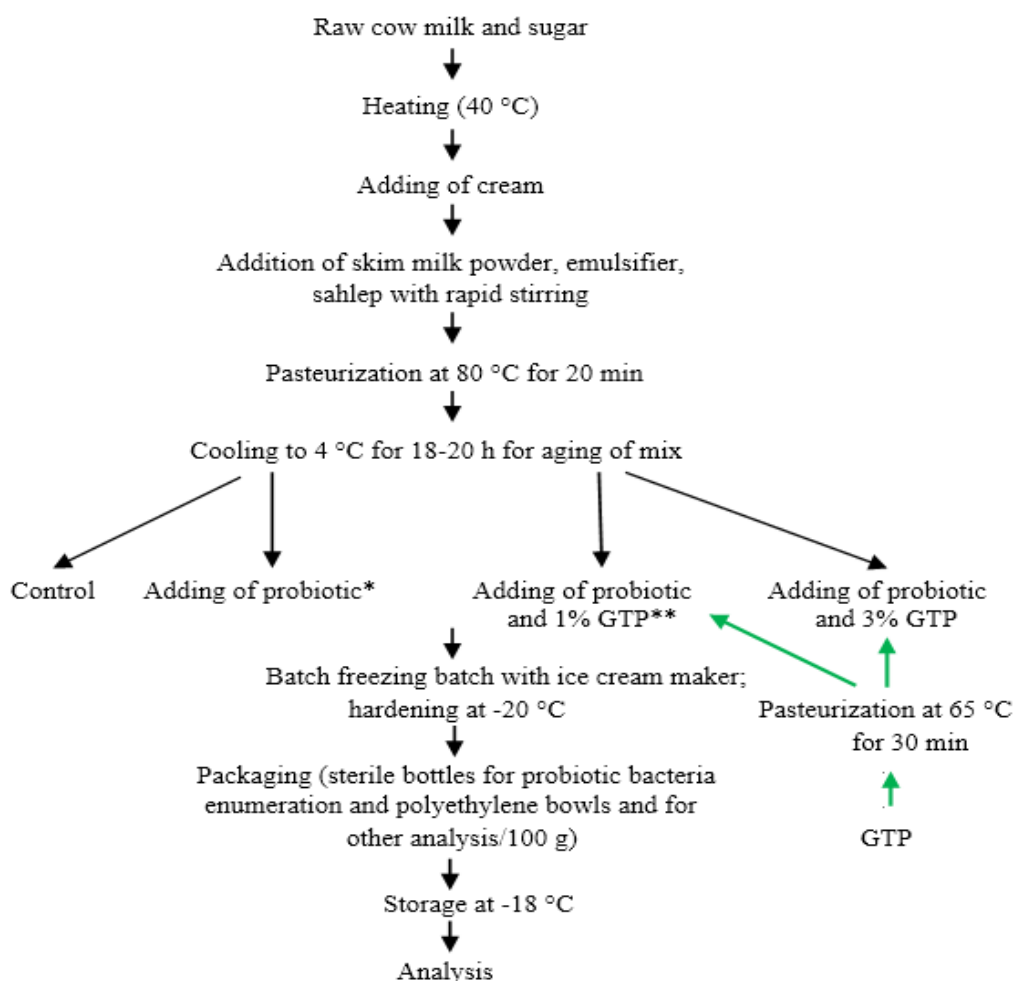
$$\text{Overrun (\%)} = (\text{weight of the ice cream mix} - \text{weight of same volume of the ice cream sample}) / (\text{weight of same volume of the ice cream sample}) \times 100$$

First dripping time and complete melting time were determined according to Guven and Karaca [16]. pH values of the samples were determined according to AOAC [17]. The chemical parameters evaluated were protein (Kjeldahl method), and Fat (Gerber method) of ice cream samples were determined according to Gürsel and Karacabey [18].

## Color Measurement

The color measurements of the ice cream samples were determined with a Minolta colorimeter CR-200 (Minolta

Camera Co., Osaka, Japan) according to the method suggested by Cakmakci et al. [19].



**Figure 1.** Processing steps for ice cream production

\*Probiotic: *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (*Bifidobacterium* BB-12)

\*\*GTP: Green tea powder

## *Bifidobacterium* BB–12 Count

The number of viable probiotic bacteria was determined at 2, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days of frozen storage at  $-20\pm 1^{\circ}\text{C}$ . 10 g ice cream sample were serially diluted (w/v) up to  $10^{-7}$  with sterile 0.85% NaCl solution. Then, spread-inoculated in duplicate onto plates of de Man, Rogosa, Sharpe agar (MRS agar, Merck) for *Bifidobacterium* BB-12. The inoculated plates were incubated in anaerobic jars for 72h at  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  anaerobically using Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Germany).

## Sensory Analysis

For the sensory assessment of the ice cream samples, fifty consumer panelists were chosen. The panel of assessors was an external panel of non-smokers who were very familiar with ice cream products [20]. Panelists were students or academic staff of Ataturk

University Food Engineering Department (Erzurum, Turkey). The samples were assessed for color, gumminess, texture, flavor, sweetness, and general acceptability. Point scale ranging from poor (1) to excellent (9) was used for sensory evaluation. For color, texture, flavor, and general acceptability criteria; A score of 9-8 means very good, 7-6 is good, 5-3 is average and 2-1 means bad. For the chewiness and sugariness criteria, 9-8 means normal/ideal, 7-6 means less, 5-3 means more, and 2-1 means no/not enough. During the sensory analysis, panelists drank warm water to neutralize the mouthfeel between samples.

## Statistical Analysis

Completely randomized factorial design was used to conduct the experiments, which included the four ice cream sample types (C, PC, P+GTP1 and P+GTP3), seven storage periods (2, 15, 30, 45, 60, 75, 90 days) and two replicates. Statistical analyzes were performed

using SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) software.

## RESULTS and DISCUSSION

### Physical and Chemical Properties

The pH, protein and fat content results of ice cream samples are shown in Table 1. The pH values of PC and P+GTP1 samples were not different statistically but the other samples were different ( $p < 0.05$ ). GTP and probiotic bacteria addition decreased pH when compared to the Control sample. Probiotic bacteria are lactic acid bacteria and they lower the pH of the ice cream as they are added to the mix. The pH of the GTP

used in the research is also 5.2 and it is lower than the pH of the mix. For these reasons, the pH of the samples can be listed as follows: C > PC > P+GTP1 > P+GTP3. GTP addition caused increases in the protein content as the relative of ice creams compared to the Control and Probiotic Control samples. As the amount of GTP added increased, the protein content of the ice cream also increased. This result can be explained by the high ratio of dry matter (95.47%) and protein (21.5%) of GTP. As the amount of GTP added increased, the fat content of the ice cream decreased (Table 1). Since it has been reported in the literature that green tea contains 7% lipid [11], it is thought that this amount may cause a slight decrease in the fat content of ice creams.

Table 1. The physical properties of ice cream samples produced

Ice cream samples <sup>1</sup>	Properties <sup>2</sup>		
	pH	Protein (%)	Fat (%)
C	6.48±0.03 <sup>a</sup>	5.14±0.19 <sup>b</sup>	5.15±0.07 <sup>ab</sup>
PC	6.27±0.01 <sup>b</sup>	4.79±0.04 <sup>c</sup>	5.20±0.14 <sup>a</sup>
P+GTP1	6.25±0.01 <sup>b</sup>	5.36±0.14 <sup>ab</sup>	5.05±0.07 <sup>ab</sup>
P+GTP3	6.19±0.01 <sup>c</sup>	5.68±0.04 <sup>a</sup>	4.93±0.04 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>C, Control sample (no GTP and P); PC, Probiotic control (containing only P); P+GTP1: containing P and 1% GTP; P+GTP3: containing P and 3% GTP; <sup>2</sup>Means ± standard deviation followed by different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Overrun is a defined an increase in volume of ice cream during processing and is related to yield and profit to the producer [21]. Overrun values were significantly different between samples ( $p < 0.05$ ) and varied from 18 to 40 % (Table 2). The lowest overrun was obtained in P+GTP1 whereas the highest was in the PC sample. The increased level of GTP decreased the overrun value. This result was similar to studies by Goraya and Bajwa [21] who added 'Indian gooseberry', Çakmakçı et al. [19] who added oleaster flour and crust, and Yangılar [22] who added banana flour and pulp in ice cream. Goraya and Bajwa [21] explained that the increasing level of gooseberry decreased overrun by weakening air incorporation. Akalin et al. [23] reported that low overrun values (varied 20.7-39.2%) could be because of using a batch type freezer for freezing process and composition of ice creams. In another study, the increased cassava

bagasse content decreased the overrun and could be the reason for the increase in viscosity of the mix, decreasing the molecular mobility, which made incorporation and uniform distribution of the air cells difficult [24]. Bahramparvar et al. [25] found that the overrun value of ice creams produced with some gums was changed between 18.8% to 28.6% and they thought that the low overrun could be related to the inefficiency of the ice cream maker in air incorporation and excessive time required for freezing. On the other hand, air in ice cream gives a light texture and effects the melt down and hardness; not only amount of air incorporated but also the distribution of size of the air cells influences these parameters [26]. The properties of ice cream depend mostly upon the components used as well as manufacturing parameters and storage [26-28].

Table 2. The technological and color properties of ice cream samples

Ice cream samples <sup>1</sup>	Technological Properties <sup>2</sup>			Color parameters		
	Overrun (%)	First dropping time (s)	Complete melting time (s)	L*	a*	b*
C	37.9±0.11 <sup>b</sup>	3620±84.8 <sup>a</sup>	5430±42.4 <sup>a</sup>	85.62±0.90 <sup>a</sup>	3.16±0.09 <sup>a</sup>	9.42±0.01 <sup>c</sup>
PC	40.5±0.10 <sup>a</sup>	2040±28.3 <sup>c</sup>	5005±21.2 <sup>b</sup>	84.19±0.95 <sup>a</sup>	3.07±0.06 <sup>a</sup>	9.61±0.28 <sup>c</sup>
P+GTP1	29.0±1.00 <sup>c</sup>	2610±42.4 <sup>b</sup>	3900±84.8 <sup>d</sup>	65.00±0.99 <sup>b</sup>	6.20±0.03 <sup>c</sup>	25.10±0.44 <sup>b</sup>
P+GTP3	18.4±0.54 <sup>d</sup>	2760±84.8 <sup>b</sup>	4080±84.8 <sup>c</sup>	54.06±0.35 <sup>c</sup>	5.08±0.72 <sup>b</sup>	26.14±0.10 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>C, Control sample (no GTP and P); PC, Probiotic control (containing only P); P+GTP1: containing P and 1% GTP; P+GTP3: containing P and 3% GTP; <sup>2</sup>Means ± standard deviation followed by different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

The first dropping and complete melting time values are given in Table 2. The highest first dropping time belonged to the control sample and the lowest one was the probiotic control sample. GTP caused longer first

dropping time to the PC sample and but the samples with GTP melted more rapidly than the PC and P samples, respectively. As the GTP ratio increased, the first dropping time and complete melting time became



longer in P+GTP1 and P+GTP3 samples (Table 2). The adding of banana peel flour affected the first dropping time positively and increasing of banana pulp caused longer first dropping times [21]. P+GTP3 sample had more protein content than P+GTP1 due to high protein content (21.5%) of GTP used in this study and this protein content can be reason for difference in melting properties. It was reported that protein structure may influence the viscosity of the ice cream mixes although total solid, fat, and protein concentrations were held constant in ice cream mix [29,30]. In addition to high protein content of green tea, drying of the leaves at high temperatures (above 100°C) can be another reason. Because of being partially denatured proteins often show important hydrophobic interactions, and the structure of the continuous phase is strengthened, causing increased amounts of bound water. Two different stevia varieties (*Stevia rebaudiana* Morita and Criolla) and extract concentrations (5% and 8%), which were used in ice cream production, had significant influence on overrun and it was shown that the higher the concentration of extract, the lower the percentage of yield of whipping in both varieties. In the same study, the ice cream made with *S. rebaudiana* Criolla sowed less tendency to melt. Authors stated that the low or rapid melting was generally linked to the amount of sweetener, stabilizer and/or emulsifier [30]. Muse and Hartel [32] showed that the extent of fat destabilization and ice crystal size had the largest effect, but overrun was not an effective factor in the melting rate and it was caused by the thickener and plasticizer effects of high levels of sugar in solution. Although slower melting rate in the ice creams with higher overruns was attributed to a lower heat transfer rate due to the larger air volume, it was also stated that it could be due to the more circuitous flow of the melting liquid [32]. Sakurai et al. [33] also reported that ice cream with high overrun began to melt slowly and showed good resistance to melting.

### Color Properties

Consumers prefer natural colors, especially processed foods. Table 2 shows the color values ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) of the ice cream samples. The  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  color values were influenced by the addition of GTP. These values significantly differed between samples ( $p < 0.01$ ). As

expected, the addition of GTP increased the redness and yellowness of ice creams but decreased the lightness. Similarly; Hezer [34] determined that the addition of purslane (*Portulaca oleracea* L.) (5, 10 and 15%) decreased  $L^*$  and  $a^*$  values and increased  $b^*$  values in ice cream samples. According to Silva Faresin et al. [35], the addition of *Spirulina platensis* powder (1%) decreased the  $L^*$  (53.95-57.17),  $a^*$  (-9.02 and -7.40), and  $b^*$  (17.99-22.11) values of ice cream samples. On the other hand, there was no statistically significant difference in control samples (C and PC). The most similar  $L^*$  value to the control samples was found in P+GTP1 sample. In sensory analysis, P+GTP1 sample with a light green color was preferred than P+GTP3 sample (Table 2).

### Viability of *Bifidobacterium* BB-12

The viable *Bifidobacterium* BB-12 counts are shown in Table 3. *Bifidobacterium* BB-12 count showed significant differences ( $p < 0.05$ ) among the samples and ranged from 7.50 to  $< 2$  log cfu/g among the samples. The highest average *Bifidobacterium* BB-12 count was found in the PC group. PC samples retained probiotic characteristics during 90 days ( $> 10^6$  cfu/g). Probiotic bacteria generally show good survivability in ice cream up to the end of shelf life [5,9]. Generally, the addition of GTP reduced the number of *Bifidobacterium* BB-12 according to the PC sample, but probiotic properties were retained up to 75 days with P+GTP1 and 60 days with P+GTP3. Perhaps, probiotic viability may have decreased during the ice cream processing, due to the lengthening of the process for more homogeneous mixing of the green tea powder. The researches have shown that the counts of probiotic bacteria decrease significantly throughout storage. However, it was stated that mixing and freezing processes during the conversion of the mixture into ice cream had a greater effect on the reduction of probiotic bacteria viability [9]. When the results are evaluated collectively; It can be said that the ice cream sample (P+GTP1) produced with the addition of 1% GTP and *Bifidobacterium* BB-12 preserves the probiotic ice cream criteria for 75 days (Table 3). As probiotic ice cream samples, PC > 90 days, P+GTP1 = 75 days and P+GTP3 = 60 days were found to have probiotic properties (Table 3).

Table 3. *Bifidobacterium* BB-12 counts of ice cream samples (log cfu/g)

Storage (day)	Ice cream samples <sup>1</sup>		
	PC <sup>2</sup>	P+GTP1	P+GTP3
2	7.50±0.50 <sup>a</sup>	7.00±0.03 <sup>a-e</sup>	7.00±0.00 <sup>a-e</sup>
15	7.30±0.30 <sup>ab</sup>	7.00±0.00 <sup>a-e</sup>	6.85±0.15 <sup>b-e</sup>
30	7.49±0.09 <sup>a</sup>	6.95±0.05 <sup>a-e</sup>	6.89±0.11 <sup>b-e</sup>
45	7.39±0.05 <sup>ab</sup>	6.93±0.08 <sup>b-e</sup>	6.93±0.07 <sup>b-e</sup>
60	7.24±0.24 <sup>a-c</sup>	6.59±0.11 <sup>de</sup>	6.69±0.09 <sup>c-e</sup>
75	7.10±0.02 <sup>a-d</sup>	6.48±0.00 <sup>e</sup>	5.84±0.09 <sup>f</sup>
90	6.54±0.27 <sup>d-e</sup>	5.86±0.09 <sup>f</sup>	-

<sup>1</sup>Means ± standard deviation followed by different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ); <sup>2</sup>PC, probiotic control (containing only P); P+GTP1: containing P and 1% GTP; P+GTP3: containing P and 3% GTP

## Sensory Properties

The sensory characteristics of ice cream samples are shown in Table 4. The ice creams with probiotic bacteria has been found to have little effect on its flavor, texture or other sensory characteristics. A similar result was also reported by Mohammadi et al. [9]. But, the addition of the GTP significantly affected the sensory qualities of the samples. Color scores were significantly different, between 6.52 and 8.32. The highest score was determined in Control. Other samples are different statistically. GTP gave a greenish color to ice cream that was desirable for some panelists, especially 1% GTP addition. The samples containing GTP showed relatively

low scores in terms of organoleptic qualities compared to the C and PC groups. However, in general, PC and P+GTP1 samples were found to be statistically similar (Table 3). The C sample is considered to have higher scores due to the usual color, texture, sweetness, etc. of the ice cream. Panelists reported that P+GTP3 sample had a mild texture and melted easily. Also, 3% GTP negatively affected all the sensorial properties. Panelists indicated that as GTP amount increases in the ice cream samples, they felt bitterness; especially the 3% GTP was more bitter. This bitterness is due to the composition of green tea and it is felt more as the usage rate increases. P+GTP1 sample was favored by the panelists after C and PC samples.

Table 4. Sensorial properties of ice cream samples

Ice cream samples <sup>1</sup>	Color <sup>2</sup>	Texture	Gumming structure	Flavor	Sweetness	General acceptability
C	8.3±0.0 <sup>a</sup>	7.8±0.0 <sup>a</sup>	7.5±0.2 <sup>a</sup>	7.6±0.1 <sup>a</sup>	8.0±0.0 <sup>a</sup>	7.8±0.3 <sup>a</sup>
PC	8.2±0.2 <sup>ab</sup>	7.6±0.2 <sup>a</sup>	7.1±0.1 <sup>b</sup>	7.0±0.5 <sup>ab</sup>	7.6±0.2 <sup>ab</sup>	7.5±0.2 <sup>a</sup>
P+GTP1	7.6±0.2 <sup>b</sup>	7.7±0.0 <sup>a</sup>	7.1±0.2 <sup>b</sup>	6.1±0.5 <sup>b</sup>	7.4±0.2 <sup>b</sup>	6.8±0.2 <sup>a</sup>
P+GTP3	6.5±0.3 <sup>c</sup>	7.3±0.1 <sup>b</sup>	6.6±0.1 <sup>c</sup>	4.4±0.3 <sup>c</sup>	6.1±0.1 <sup>c</sup>	4.8±0.8 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>C, control sample (no GTP and P); PC, probiotic control (containing only P); P+GTP1: containing P and 1% GTP; P+GTP3: containing P and 3% GTP; <sup>2</sup>Means ± standard deviation followed by different letters in the same column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSIONS



In the production of probiotic ice cream with *Bifidobacterium* BB-12, and 1% GTP supplement, the probiotic property of the ice cream was preserved for up to 75 days. The ice cream containing 1% GTP were preferred by the panelists in respect to sensorial properties following the C and PC samples. In general, PC and P+GTP1 samples were found to be statistically similar. Given GTP's nutritive content and functional properties, it may be used as a suitable of natural additive in ice cream production to enhance nutritional value, antioxidant capacity and natural greenish color. Overall evaluation of the results led to the conclusion that 1% GTP may be a suitable natural additive in probiotic ice cream formulation in spite of its slight bitterness. However, conscious consumers, who know the benefits of green tea, probiotics, and health effect said that a slight bitterness caused by tea in ice cream with 1% GTP is not important.

## REFERENCES

- [1] da Silva, V.M., Minim, V.P.R., Ferreira, M.A.M., de Paula Souza, p.H., da Silva Moraes L.E., Minim, L.A. (2014). Study of the perception of consumers in relation to different ice cream concepts. *Food Quality and Preference*, 36, 161-168.
- [2] Bhat, Z., Bhat, H. (2011). Milk and dairy products as functional foods: a review. *International Journal of Dairy Science*, 6(1), 1-12.
- [3] Gheisari, H.R., Ahadi, L., Khezli, S., Dehnavi, T. (2016). Properties of ice-cream fortified with zinc and *Lactobacillus casei*. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 15(4), 367-377.
- [4] Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9, 497-505.
- [5] Turgut, T., Çakmakçı, S. (2009). Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 62(3), 444-451.
- [6] Dantas, A., Verruck, S., Canella, M.H.M., Hernandez, E., Prudencio, E.S. (2021). Encapsulated *Bifidobacterium* BB-12 addition in a concentrated lactose-free yogurt: Its survival during storage and effects on the product's properties. *Food Research International*, 150, 110742.
- [7] Kailasapathy, K., Harmstorf, I., Phillips, M. (2008). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1317-1322.
- [8] Tripathi, M.K., Giri, S.K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 25-241.
- [9] Mohammadi, R., Mortazavian, A.M., Khosrokhavar, R., da Cruz, A.G. (2011). Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties. *Annals of Microbiology*, 61(3), 411-424.
- [10] Kilara, A., Chandan, R.C. (2006). Ice cream and frozen desserts. In: Handbook of Food Products Manufacturing, Book Editor: Y.H. Hui. Chapter 74 (p593-633).
- [11] Cabrera, C., Artacho, R., Giménez, R. (2006). Beneficial effects of green tea - A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25(2), 79-99.
- [12] Namal Senanayake, S.P.J. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications: A review. *Journal of Functional Foods*, 5, 1529-1541.
- [13] Najgebauer-Lejko, D. (2014). Effect of green tea supplementation on the microbiological,

- antioxidant, and sensory properties of probiotic milks. *Dairy Science and Technology*, 94, 327–339.
- [14] Çakmakçı, S., Öz, E., Çakıroğlu, K., Polat, A., Gülçin, İ., Ilgaz, Ş., Seyyedcheraghi, K., Özhamamcı, İ. (2019). Probiotic shelf life, antioxidant, sensory, physical and chemical properties of yogurts produced with *Lactobacillus acidophilus* and green tea powder. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25 (5), 673-682.
- [15] Marshall, R.T., Goff, H.D., Hartel, R.W. (2003). *Ice Cream*, 6<sup>th</sup> edn. Chapman and Hall, New York.
- [16] Guven, M., Karaca, O.B. (2002). The effects of varying sugar content and fruit concentration on the physical properties of vanilla and fruit ice-cream-type frozen yogurts. *International Journal of Dairy Technology*, 5, 27-31.
- [17] AOAC (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edn. Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- [18] Gürsel, A., Karacabey, A. (1998). Dondurma Teknolojisine İlişkin Hesaplamalar, Receteler ve Kalite Kontrol Testleri (Calculations Related to Ice Cream Technology, Prescriptions and Quality Control Tests: Ankara University Publication No: 1498, Ankara, Turkey, ISBN 975-482-431-2.
- [19] Çakmakçı, S., Topdaş, E.F., Kalın, P., Han, H., Şekerçi, P., Köse, L.P., Gülçin, İ. (2015). Antioxidant capacity and functionality of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour and crust in a new kind of fruity ice cream. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 472-481.
- [20] Sulejmani, E., Demiri, M. (2020). The effect of stevia, emulsifier and milk powder on melting rate, hardness and overrun of ice cream formulations during storage. *Mljekarstvo*, 70 (2), 120-130.
- [21] Goraya, R.K., Bajwa, U. (2015). Enhancing the functional properties and nutritional quality of ice cream with processed amla (Indian gooseberry). *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7861-7871.
- [22] Yangılar, F. (2015). Effects of green banana flour on the physical, chemical and sensory properties of ice cream. *Food Technology and Biotechnology*, 53(3), 315-323.
- [23] Akalın, A.S., Karagözlü, C., Ünal, G. (2008). Rheological properties of reduced-fat and low-fat ice cream containing whey protein isolate and inulin. *European Food Research and Technology*, 227(3), 889-895.
- [24] Fernandes, D.D., Leonel, M., Del Bem, M.S., Mischán, M.M., Garcia, E.L., dos Santos, T.P.R. (2017). Cassava derivatives in ice cream formulations: effects on physicochemical, physical and sensory properties. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 54(6), 1357-1367.
- [25] Bahramparvar, M., Haddad Khodaparast, M.H., Razavi, S. (2009). The effect of *Lallemantia royleana* (Balangu) seed, palmate-tuber salep and carboxymethylcellulose gums on the physicochemical and sensory properties of typical soft ice cream. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 571-576.
- [26] Sofjan, R.P., Hartel, R.W. (2004). Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream. *International Dairy Journal*, 14(3), 255-262.
- [27] Flores, A.A., Goff, H.D. (1999). Ice crystal size distributions in dynamically frozen model solutions and ice cream as affected by stabilizers. *Journal of Dairy Science*, 82, 1399-1407.
- [28] Warren, M.M., Hartel, R.W. (2018). Effects of emulsifier, overrun and dasher speed on ice cream microstructure and melting properties. *Journal of Food Science*, 83 (3), 639-647.
- [29] Lim, S.Y., Swanson, B., Ross, C., Clark, S. (2008). High hydrostatic pressure modification of whey protein concentrate for improved body and texture of lowfat ice cream. *Journal of Dairy Science*, 91, 1308-1316.
- [30] Syed Q.A., Anwar, S., Shukat R., Zahoori T. (2018). Effects of different ingredients on texture of ice cream. *Journal of Nutritional Health and Food Engineering*, 8(6), 422-435.
- [31] Aranda-Gonzalez, I., Perera-Pacheco, M., Barbosa-Martin, E., Betancur-Ancona, D. (2016). Replacing sugar with *S. rebaudiana* extracts on the physicochemical and sensory properties of strawberry ice cream. *Ciência Rural*, 46, 604-609.
- [32] Muse, M., Hartel, R.W. (2004). Ice cream structural elements that affect melting rate and hardness. *Journal of Dairy Science*, 87, 1-10.
- [33] Sakurai, K., Kokubo, S., Hakamata, K., Tomita, M., Yoshida, S. (1996). Effect of production conditions on ice cream melting resistance and hardness. *Milchwissenschaft*, 51(8), 451-454.
- [34] Hezer, F. (2019). Farklı Oranlarda Semizotu İlavesinin Dondurmanın Fiziksel, Kimyasal ve Duyusal Özelliklerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Gümüşhane, 72s.
- [35] Silva Faresin, L., Devos, R.J.B., Reinehr, C.O., Colla, L.M. (2022). Development of ice cream with reduction of sugar and fat by the addition of inulin, *Spirulina platensis* or phycocyanin. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 27, 100445.

## Süt Tozu, Peyniraltı Suyu İzolatı veya İnülin ile Kurumaddesi Arttırılan ve Kalsiyum Klorür Eklenen Sütlerden Üretilen Probiyotik Yoğurtların Bazı Fizikokimyasal, Mikrobiyolojik ve Duyusal Özellikleri

Firuze Ergin  

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 25.04.2022, Kabul Tarihi (Accepted): 25.06.2022

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [fergin@akdeniz.edu.tr](mailto:fergin@akdeniz.edu.tr) (F. Ergin)

☎ 0 242 310 43 44 📠 0 242 310 63 06

### ÖZ

Bu çalışmada, kurumaddesi süt tozu, peyniraltı suyu izolatı veya inülin kullanılarak arttırılan sütler gerek kalsiyum klorür ilave edildikten sonra gerekse ilave edilmeden probiyotik yoğurt üretiminde kullanılmıştır. Üretilen probiyotik yoğurt örnekleri 4°C'de 30 gün süresince depolanmış ve depolamanın 1., 15. ve 30. günlerinde örneklerin fizikokimyasal, duyusal ve mikrobiyolojik özellikleri belirlenmiştir. Kalsiyum klorür ilavesinin sütlerin pH değerlerini düşürdüğü ve inkübasyon süresini arttırdığı tespit edilmiştir. Peyniraltı suyu izolatı ilave edilen sütlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin serum ayrılması değerlerinin süt tozu ve inülin ilave edilen süttten üretilen yoğurt örneklerinden düşük; görünür viskozite, kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Süte kalsiyum klorür ilavesinin probiyotik yoğurt örneklerinin serum ayrılması değerlerini ve reolojik özelliklerini istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilediği saptanmıştır. Peyniraltı suyu izolatı ile kurumadde miktarı arttırılan süttten üretilen probiyotik yoğurt örneklerinde en yüksek granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerleri belirlenirken, kalsiyum klorür ilavesinin probiyotik yoğurtların görsel niteliklerini geliştirdiği tespit edilmiştir. Depolama süresince probiyotik yoğurt örneklerinde *Lactobacillus paracasei* sayısının 7.71-8.98 log kob/g arasında değiştiği ve süte kalsiyum klorür ilavesinin probiyotik bakteri canlılığını etkilemediği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** İnülin, Kalsiyum klorür, Peyniraltı suyu izolatı, Probiyotik yoğurt, Süt tozu

### Some Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties of Probiotic Yoghurts Produced from Milk with Increased Dry Matter Content by Addition of Milk Powder, Whey Isolate or Inulin before and after Calcium Chloride Incorporation

#### ABSTRACT

In this study, probiotic yoghurt was produced after adding calcium chloride to the milk whose dry matter content was increased with milk powder, whey isolate or inulin. Probiotic yoghurt samples were stored at 4°C for 30 days and the physicochemical, sensory and microbiological properties of samples were determined on the 1<sup>st</sup>, 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days of storage. The addition of calcium chloride decreased the pH values of milks and increased incubation time. Syneresis values were determined in probiotic yoghurt samples produced from milk whose dry matter content was increased with whey isolate were lower than probiotic yoghurt samples produced from milk whose dry matter content was increased with milk powder and inulin, while apparent viscosity, consistency coefficient and thixotropy values were high. The addition of calcium chloride influenced the syneresis values and rheological properties of probiotic yoghurt samples significantly (p<0.05). While the highest number and perimeter of grains and visual roughness values were determined in probiotic yoghurt samples produced from milk with increased dry matter content by the addition of whey isolate, the addition of calcium chloride improved the visual properties of probiotic yoghurts. The number of

*Lactobacillus paracasei* in probiotic yogurt samples during storage varied between 7.71 and 8.98 log cfu/g, and the addition of calcium chloride did not adversely influence the number of probiotic bacteria.

**Keywords:** Inulin, Calcium chloride, Whey isolate, Probiotic yoghurt, Milk powder

## GİRİŞ

Günümüzde sağlıklı ve uzun yaşam beklentisi, gıda-sağlık arasındaki ilişki ile ilgili bilincin artması, tüketicileri doğal besin kaynakları ve fonksiyonel gıdalara yönlendirmektedir [1]. Fonksiyonel gıdalar, temel besin öğelerini karşılamalarının yanı sıra, bazı hastalıklara yakalanma riskini azaltan ve bazı hastalıkların iyileşmesinde rol alan, biyoaktif bileşenleri içeren gıda veya gıda bileşeni olarak tanımlanmaktadır [2]. Tüketicilerin fonksiyonel gıdalara ilgisinin artması süt endüstrisinde ekonomik değeri yüksek yeni yoğurt çeşitlerinin üretilmesine neden olmaktadır [3]. Sütün *Streptococcus thermophilus* ve *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterileriyle fermantasyonu sonucu üretilen yoğurt, besleyici ve sağlığa faydalı özellikleri nedeniyle en çok tüketilen süt ürünlerinden biridir [4]. Yoğurdun söz konusu özelliklerinin geliştirilmesi için üretiminde mineral madde ve vitamin zenginleştirilmesi yapılabilmekte ve probiyotik bakteri kullanılabilmektedir [5].

İnsan vücudunda en çok bulunan mineral madde olan kalsiyum, kemiklerin oluşmasında ve güçlenmesinde, kas ve sinir sisteminin çalışmasında, hormonların salgılanmasında ve enzimlerin aktivasyonda görev almaktadır. İnsanların yaş ve fizyolojik durumlarına bağlı olarak diyetle günde 1000-1300 mg kalsiyum alması önerilmektedir. Kalsiyumun vücuttaki emilimi ilerleyen yaşlarda azalmakta ve kalsiyum yetersizliğine bağlı hastalıklar ortaya çıkmaktadır [6]. Kalsiyum kaynakları; kurubaklagiller, sert kabuklu yemişler, yağlı tohumlar, bazı meyve ve sebzeler ile süt ve süt ürünleri olarak sıralanabilmektedir [7]. Gıdalarla vücuda alınan kalsiyumun emilimi kaynağına göre değişmektedir. Vücuda süt ve süt ürünleriyle alınan kalsiyumun emilim oranının, okzalik asit ve fitik asit bakımından zengin olan kurubaklagillerle alınan kalsiyumun emilim oranına göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir [7]. Fermente süt ürünlerinde bulunan kalsiyumun emilim oranının ise süte göre daha yüksek olduğu ve bu nedenle yoğurt gibi fermente süt ürünlerinin kalsiyum ile zenginleştirilmesinin önemli olduğu belirtilmektedir [8]. Kalsiyum sağlıkla ilgili olumlu özelliklerinin yanı sıra yoğurdun jel yapısının oluşumunda da rol oynamaktadır [9]. Sütteki kalsiyum çözünür veya koloidal formda (koloidal kalsiyum fosfat) bulunmaktadır. Yoğurt jeli, sütte kalsiyum dağılımının dengesindeki değişiklikler ve süt proteinleri arasında hidrofobik etkileşimler sonucu oluşmaktadır. Sütün pH değerindeki değişiklikler, süte uygulanan ısı işlem veya ilave edilen kalsiyum tuzları ya da şelat ajanları, sütteki kalsiyum dağılımındaki dengenin değişmesine ve sütün işlenmesi sırasında kazein sisteminin stabilitesinin etkilenmesine neden olmaktadır. Sütün yoğurt bakterileri tarafından fermantasyonu sırasında oluşan laktik aside bağlı olarak kazein misellerindeki koloidal kalsiyum fosfat

çözünmekte ve kazein miselleri yoğurdun jel yapısını oluşturmak üzere bir araya gelmektedir [10].

Yoğurdun yapısını, besleyici değerini ve raf ömrünü etkileyen bir diğer işlem basamağı da sütteki kurumadde miktarının süt bazlı tozların ilavesi, evaporasyon ve membran filtrasyon sistemleri gibi yöntemlerle artırılmasıdır [3,11]. Yağsız süt tozu, peyniraltı suyu tozları (peyniraltı suyu konsantrati, peyniraltı suyu protein izolati, polimerize peyniraltı suyu tozu) ve kazein tozları (kalsiyum kazeinat, sodyum kazeinat) ile çeşitli karbonhidrat yapıdaki prebiyotikler (inülin, laktuloz, glukan, maltodekstrin) yoğurda işlenecek sütün kurumaddesinin artırılmasında kullanılabilmektedir [12, 13]. Peyniraltı suyu protein izolatinin kullanımı, sıkı bir yoğurt jeli elde etmek ve içerdiği yüksek orandaki peyniraltı suyu proteinleri ile yoğurdun besin değerini arttırmak amacıyla tercih edilebilmektedir [14]. Prebiyotik olarak kabul edilen inülin süt ürünlerinin kimyasal, fonksiyonel ve duyuşsal özelliklerini geliştirmektedir [15]. İnülin, fruktoz ve glukoz birimlerinin  $\beta$ -1,2 glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşan düşük kalori değerine sahip bir oligosakkarittir. Yoğurt üretiminde yağ ve şeker ikame maddesi olarak kullanılabilen inülin, insan bağırsağında probiyotik bakterilerin canlılığını desteklemekte ve böylelikle gastrointestinal hastalıkların önlenmesinde, kalsiyum emiliminin artmasında ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde rol almaktadır [15].

Probiyotikler, yeterli miktarda alındığı zaman konakçı üzerinde sağlığa yararlı etkiler sağlayan canlı mikroorganizmalar olarak tanımlanmaktadır. Probiyotik bakterilerden beklenen yararların sağlanabilmesi için ürünlerin raf ömürlerinin sonuna kadar en az  $10^7$ - $10^9$  kob/g düzeyinde probiyotik bakteri bulundurması gerektiği belirtilmektedir [16]. Probiyotik bakterilerin canlılıklarını fermente süt ürünlerinin pH değeri, hidrojen peroksit ve çözünmüş oksijen içeriği, laktik asit ve asetik asit gibi metabolitlerin konsantrasyonu, üretiminde kullanılan doğal bileşikler, ortamın tampon kapasitesi ve depolama sıcaklığı gibi faktörler etkileyebilmektedir [17]. Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarla probiyotik bakterilerden biri olan *Lactobacillus paracasei*'nin hipokolesterolemi, antihipertansif, antiosteoporoz, antimutajenik, antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar gibi insan sağlığına faydalı etkileri olduğu belirlenmiştir [18]. Ayrıca, *L. paracasei*'nin fermente süt ürünlerinin üretiminde, depolanmasında ve tüketimindeki olumsuz koşullara karşı canlılığını koruyabildiği bildirilmiştir [19]. Bu çalışmada söz konusu bilgiler ışığında probiyotik yoğurt üretiminde *L. paracasei* kullanılmıştır.

Farklı kalsiyum tuzları ilave edilen sütlerden yoğurt, meyveli yoğurt, probiyotik yoğurt ve probiyotik fermente içeceklerin üretildiği çalışmalarda [8, 10, 20] kalsiyumun ilavesinin söz konusu ürünlerin yapısal, duyuşsal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi ortaya

konulmuştur. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, sütteki kalsiyum miktarı değişikliğinin [10] ve kurumadde artırımında kullanılan bileşenlerin [14, 15] yoğurdun özelliklerini etkilediği ortaya konulmakla birlikte her iki varyasyonun birlikte etkisini incelememiştir. Yapılan bu çalışma, probiyotik yoğurdun bazı özellikleri üzerine kalsiyum miktarının ve kurumadde artırımında kullanılan bileşenlerin etkisinin bir arada incelenmesi açısından özgündür. Bu bağlamda çalışmada, kurumadde miktarı yağsız süt tozu, peyniraltı suyu izolatu ve inülin ile arttırılan sütlerden kalsiyum klorür ilave edilerek ya da ilave edilmeksizin *Lactobacillus paracasei* kullanılarak probiyotik yoğurt üretilmiştir. Çalışmada, kurumadde artırımında kullanılan bileşenlerin ve kalsiyum klorürün probiyotik yoğurt örneklerinin bazı fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşsal özellikleri üzerine etkisi depolama süresince belirlenmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Probiyotik yoğurt üretimlerinde kullanılan inek sütü AAA Üniversitesi Ziraat Fakültesi Döner Sermayesi'ne bağlı Sığır Çiftliği'nden, yoğurt starter kültürü (YOFLEX® M790) ve probiyotik bakteri *Lactobacillus paracasei* (L. CASEI 431®) Chr. Hansen Gıda San. Tic. A.Ş.'den (İstanbul, Türkiye), yağsız süt tozu (%95 kurumadde, %40 laktöz) Ekso Süt ve Gıda Mam. San. ve Tic. A.Ş.'den (Antalya, Türkiye), peyniraltı suyu izolatu (Hardline Nutrition, %96 protein) Kavi Gıda San. Tic. Ltd. Sti.'den (İstanbul, Türkiye), inülin (Frutafit HD, %90 inülin) Sensus'dan (Roosendaal, Hollanda), kalsiyum klorür (Calcium chloride anhydrous powder, 110.98 g/mol) ile fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analizlerde kullanılan kimyasallar Merck İlaç Ecza ve Kimya Tic. A.Ş.'den (İstanbul, Türkiye) temin edilmiştir.

### Probiyotik Yoğurt Üretimi

Probiyotik yoğurt üretimlerinde kullanılan inek sütü (kurumadde %12.0, yağ %3.4, protein %3.3, kül %0.7) 55°C'ye ısıtılarak yağ oranı separatör (G140 model, SMS Ltd. Şti., Kayseri, Türkiye) yardımıyla %0.1'e ayarlanmıştır. Yağsız sütün kurumadde miktarı yağsız süt tozu, peyniraltı suyu izolatu ve inülin kullanılarak yaklaşık %12 olacak şekilde ayarlanmıştır. Kurumadde standardize edilen sütler iki kısma ayrılmış ve ilk kısma kalsiyum miktarı 50 mg/100 mL süt olacak şekilde kalsiyum klorür ilave edilmiştir [19]. Sütlerin kalan kısmına ise kalsiyum klorür ilavesi yapılmamıştır. Yapılan ön denemelerde kurumadde miktarı peyniraltı suyu izolatu kullanılarak arttırılan ve kalsiyum klorür ilave edilen sütlerde 90°C'de 5 ve 10 dakika uygulanan ısı işlemler sonucunda koagülasyon yapı tespit edilmiştir. Söz konusu nedenle peyniraltı suyu proteinlerinde %5'den az denatürasyona neden olan 80°C'de 10 dakika ısı işlem sıcaklığı ve süresi seçilmiştir [21]. Sütler 80°C'de 10 dakika süresince ısı işlem uygulandıktan sonra 42°C'ye soğutulmuştur. Soğutulan sütler liyofilize olarak satın alınan 0.04 g/L oranında yoğurt starter kültürü ile 0.05 g/L oranında *L. paracasei* aşılanmış ve

sütler 42°C'de pH'sı 4.6'ya ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. Çalışmada probiyotik yoğurtlar pıhtısı parçalanmış (stirred) tipte üretilmiştir. Bu doğrultuda, inkübasyon sonunda elde edilen probiyotik yoğurtlar 4°C'ye soğutulmuş ve analizler sırasında homojen yapının sağlanması için mikser (Bosch Mixxo Quattro, Jesenice, Slovenia) ile 30 saniye karıştırılmıştır. Daha sonra probiyotik yoğurt örnekleri 200 ml'lik kapaklı plastik ambalajlar içerisine doldurulmuş ve 30 gün süresince 4°C'de depolanmıştır. Probiyotik yoğurt üretimine ait akış şeması Şekil 1'de verilmiştir.

## Analizler

### Sütte Yapılan Analizler

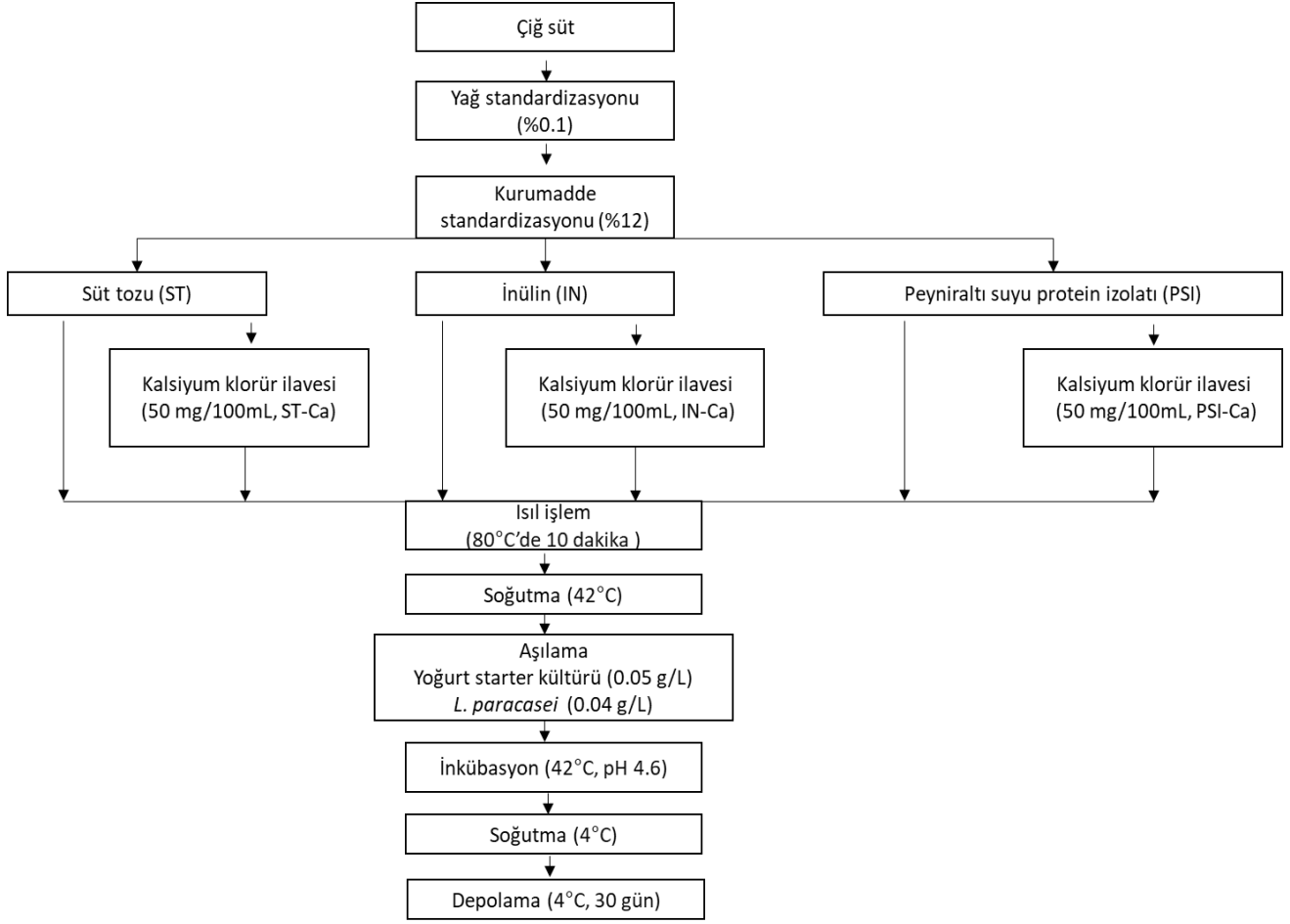
Probiyotik yoğurt üretiminde kullanılan sütün kurumadde [22], protein [23], yağ [24] ve kül [25] miktarları sırasıyla gravimetrik yöntem, Gerber yöntemi, Kjeldahl yöntemi ve gravimetrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan sütlerin ve probiyotik yoğurt örneklerinin pH değerleri pH metre (Orion 2 Star, Thermo Scientific, Ayer Rajah Crescent, Singapore) ile ölçülürken, titrasyon asitliği değerleri % laktik asit cinsinden titrimetrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir [26].

### Probiyotik Yoğurtlarda Fizikokimyasal Analizler

Probiyotik yoğurt örneklerinin toplam kurumadde ve kül miktarları Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF)'nin verdiği referans metoda göre gravimetrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir [27]. Protein miktarı Kjeldahl metodu ile belirlenmiş olup [28], serum ayrılması değeri ise Arango ve ark.'nın [29] bildirdikleri yöntemle göre saptanmıştır.

### Probiyotik Yoğurtlarda Görüntüleme Analizleri

Probiyotik yoğurt örneklerindeki granüllü yapının belirlenmesinde, granül sayısı ve granül çevre uzunluğu olmak üzere iki parametre kullanılmıştır. Söz konusu parametreler, görüntüleme analizi ile Küçükçetin ve ark. [30] belirttikleri yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Görüntüleme analizinde BAB Bs200 (BAB Image Analysing Systems Inc., Ankara, Türkiye) yazılımı kullanılmış, granül sayısı belirlenmesinde 3 mL probiyotik yoğurt örneğinde çevre uzunluğu 1.0 mm'den büyük olan granüller dikkate alınmıştır. Görüntüleme analizinde kullanılan fotoğraflar, dijital görüntüleme kabini (B430, Sanoto, Guangdong, Çin) içinde sabit ışık altında dijital fotoğraf makinası (EOS 450D, Canon, Tokyo, Japonya) ile çekilmiştir (Şekil 2). Probiyotik yoğurt örneklerinde görsel pürüzlülüğünün belirlenmesinde yoğurttaki granüllü yapı analizinde elde edilen dijital görüntüler kullanılmıştır. Söz konusu probiyotik yoğurt görüntülerinin renk yoğunluk dağılımının belirlenmesi prensibine dayanan görsel pürüzlülük analizinde Küçükçetin [31] geliştirdiği eşitlik kullanılmıştır.



Şekil 1. Kurumadde miktarı yağsız süt tozu, peyniraltı suyu izolatı veya inülin ile artırılan sütlerden kalsiyum klorür ilave edilerek ya da ilave edilmeksizin probiyotik yoğurt üretimi

Figure 1. Production of probiotic yoghurt which was produced after adding calcium chloride to milk with increased dry matter content by the addition of milk powder, whey isolate or inulin



a



b

Şekil 2. Görüntüleme analizinde kullanılan cihazlar (a) ve probiyotik yoğurt örneğine ait görüntü (b)

Figure 2. Devices used in imaging analysis and image of probiotic yogurt sample

### Probiyotik Yoğurtlarda Reolojik Analizler

Probiyotik yoğurt örneklerine ait reolojik parametreler Koksoy ve Kılıc [32]'un belirttikleri yöntemle belirlenmiştir. Örneklerin reolojik ölçümleri Brookfield R/S plus reometre kullanılarak (Brookfield, Middleboro, MA, ABD) yapılmıştır. Ölçümlerde çift boşluklu eş merkezli silindirik geometrisine (double gap concentric cylinder geometry) sahip DG3 numaralı prob kullanılmıştır. Ölçüm sırasında su banyosu (Brookfield TC-502) kullanılarak örneklerin sıcaklığı 10°C'de sabit tutulmuştur. Isıl dengenin sağlanabilmesi için örnekler ölçüm kabında yaklaşık 2 dakika bekletildikten sonra ölçümlere başlanılmıştır. Kontrollü artan ve azalan kayma hızında örneklerin kayma gerilimleri ölçülmüştür. Kayma hızı 0.1'den 300'e 1/saniye artırılarak 5 dakika çıkış ve 300'den 0.1'e 1/saniye azaltılarak 5 dakika iniş eğrileri belirlenmiştir. Örneklerin reolojik özellikleri, çıkış ve iniş eğrilerine ait veriler kullanılarak, üslü yasa modeline göre Rheo3000 (Rheotec Messtechnik GmbH, Berlin, Germany) yazılımı ile belirlenmiştir. Örneklerdeki tiksotropi iniş ve çıkış eğrilerinin arasında kalan alanın Rheo3000 yazılımı kullanılarak hesaplanması ile tespit edilmiştir.

### Probiyotik Yoğurtlarda Mikrobiyolojik Analizler

Probiyotik yoğurt örneklerinde mikrobiyolojik analizler Tharmaraj ve Shah [33]'in kullandıkları yöntemle gerçekleştirilmiştir. *Streptococcus thermophilus* sayımında %1 laktöz ilave edilmiş M-17 agar besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonların her birinden besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılmış ve petri kutuları 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayımı için pH değeri 5.2'ye ayarlanmış MRS agar besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan dökme plak yöntemi ile ekim yapılarak petri kutuları anaerobik jara yerleştirilmiş ve Anaerocult® A (Merck, Darmstadt, Almanya) anaerobik kit varlığında 43°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. *Lactobacillus paracasei* sayımında MRS agar besiyerine 1 mg/L olacak şekilde vankomisin eklenmiştir. Analiz dökme plak sayım yöntemi ile yapılmış olup, inkübasyon anaerobik ortamda 37°C'de 72 saat süresince gerçekleştirilmiştir.

### Probiyotik Yoğurtlarda Duyusal Analizler

Probiyotik yoğurt örneklerinde duyusal analiz, Mkaadem ve ark. [34]'nin çalışmalarında fermente süt ürünleri için kullandıkları yöntemle yapılmıştır. Probiyotik yoğurt örnekleri, görünüş, tat, yapı ile genel beğeni bakımından 5 puanlık hedonik skalaya (1-çok kötü, 2-kötü, 3-orta, 4-iyi ve 5-çok iyi) göre değerlendirilmiştir. Duyusal analizin gerçekleştirilmesi için AAA Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü lisansüstü öğrencilerinden düzenli fermente süt ürünleri tüketen 30 kişilik panelist grup oluşturulmuştur. Probiyotik yoğurt örnekleri panelistlere tesadüfi üç haneli kodlu olarak sunulmuştur. Çalışmada, probiyotik yoğurt örneklerinin kurumadde, protein ve kül içerikleri ile görsel özellikleri depolamanın 1. gününde; pH, titrasyon asitliği, serum ayrılması değerleri ile

reolojik, mikrobiyolojik ve duyuşal özellikleri depolamanın 1, 15 ve 30. günlerinde belirlenmiştir.

### İstatistiksel Analizler

Araştırma 2 tekerrürlü yapılmış olup, analizler paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçları varyans analizine tabi tutulmuş ve farklı bulunan sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır. Veriler %95 güven aralığında,  $p < 0.05$  anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir [35].

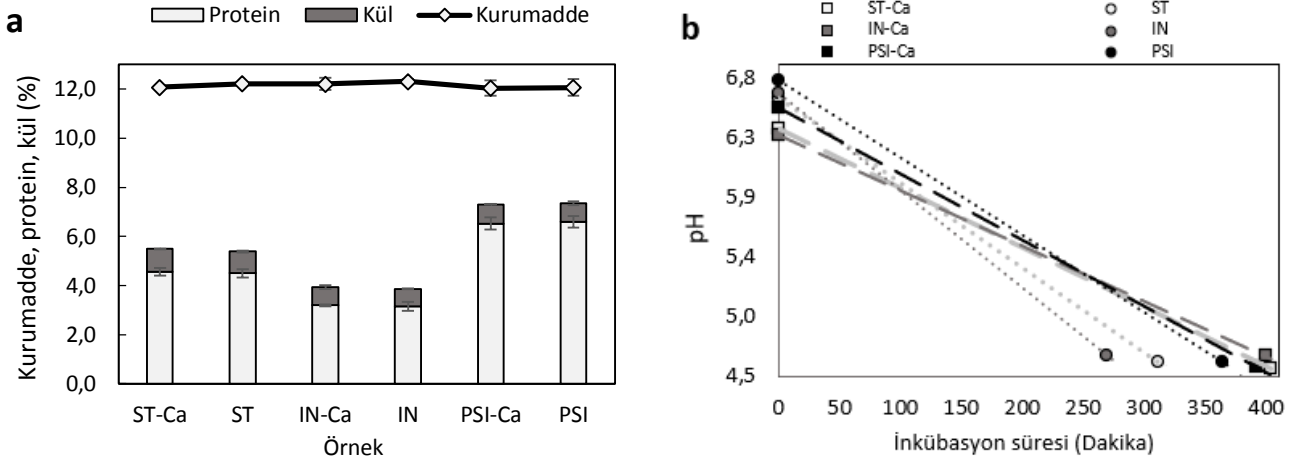
### BULGULAR ve TARTIŞMA

#### Probiyotik Yoğurt Örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Probiyotik yoğurt örneklerinin kurumadde değerlerinin ortalama %12.04 ile 12.31 arasında değiştiği belirlenmiştir. Peyniraltı suyu izolatu ilave edilerek üretilen probiyotik yoğurtların protein içeriklerinin istatistiksel olarak süt tozu ve inülin ilave edilerek üretilen probiyotik yoğurt örneklerinden yüksek olduğu saptanırken ( $p < 0.05$ ), süt tozu ilave edilerek üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin kül içeriklerinin peyniraltı suyu izolatu ve inülin ilave edilerek üretilen probiyotik yoğurt örneklerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3a). Probiyotik yoğurtların üretiminde kullanılan kalsiyum klorürün örneklerin kurumadde, protein ve kül içerikleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Probiyotik yoğurt örneklerinin bileşimleri arasındaki farklılığın kurumaddeyi arttırmak için kullanılan tozların bileşimlerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Türk Gıda Kodeksi Fermente Süt Ürünleri Tebliği'ne göre yoğurdun protein miktarının en az %3 olması gerekmektedir [36]. Elde edilen sonuçlara göre çalışmada üretilen probiyotik yoğurtların, standart ve tebliğ ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Probiyotik yoğurt örneklerinin pH değerlerinin yaklaşık 4.6'ya gelmesi için gereken inkübasyon süreleri Şekil 3b'de verilmiştir. Kalsiyum klorür ile zenginleştirilen sütlerin pH değerlerinin 6.32 ile 6.53 arasında değiştiği ve kalsiyum klorür ilavesinin sütün pH değerini düşürdüğü belirlenmiştir. Kalsiyum klorürün sütte çözünmesiyle serbest hale gelen kalsiyum iyonları sütteki hidrojen fosfat ile birleşmekte ve serbest hidrojen iyonları oluşmaktadır. Söz konusu durum sütün pH değerinin düşmesi ile sonuçlanmaktadır [9]. Bununla birlikte, kalsiyum klorür ile zenginleştirilen sütlerin pH değerlerinin fermantasyon ile yaklaşık 4.6'ya gelmesi için geçen sürenin kalsiyum klorür ilave edilmeyen sütlere göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak Kaushik ve Arora'nın [37] yaptıkları çalışmada, kalsiyum tuzları (fosfat dibasik ve kalsiyum sitrat tetrahidrat) ilave ettikleri ve ilave etmedikleri sütlerin fermantasyonu sırasında pH değerlerinin 4.4-4.8'e gelmesi için gereken sürelerin sırasıyla yaklaşık 8 ve 4 saat olduklarını saptamışlar ve kalsiyum tuzları ilavesinin sütün tamponlama kapasitesini değiştirebileceğini bildirmişlerdir.





Şekil 3. Probiyotik yoğurt örneklerine ait kurumadde, protein, kül miktarları (a), Probiyotik yoğurt örneklerine ait inkübasyon süreleri (b). ST-Ca, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. ST, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. IN-Ca, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. IN, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. PSI-Ca, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. PSI, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

*Figure 3. Dry matter, protein, and ash contents of probiotic yoghurt samples (a), incubation time of probiotic yoghurt samples (b). St-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder and calcium chloride-added. St, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder. IN-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin and calcium chloride-added. IN, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin. PSI-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate and calcium chloride-added. PSI, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate. The error bars represent standard deviation of the mean.*

Probiyotik yoğurt örneklerine ait pH ve titrasyon asitliği değerleri Şekil 4'te verilmiştir. Depolamanın sonunda süt tozu ile kurumaddesi artırılan süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin pH değerlerinin inülin ve peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerine göre düşük olduğu tespit edilmiştir. ( $p < 0.05$ ) Bununla birlikte peyniraltı suyu izolatu ilave edilen süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin inülin ilave edilen süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Süttteki laktozun laktik asit bakterileri tarafından laktik aside dönüştürülmesiyle asitlik gelişmekte ve yoğurt üretilmektedir [38]. Probiyotik yoğurt üretiminde kullanılan süt tozunun laktoz içeriğinin inülin ve peyniraltı suyu izolatına göre yüksek olmasının süt tozu ile kurumaddesi artırılan süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin inülin ve peyniraltı suyu izolatu ilave edilerek üretilen probiyotik yoğurt örneklerine göre yüksek olmasına neden olabileceği değerlendirilmiştir. Rashid ve ark. [39] süte %5, 10, 15, 20, 25 ve 30 oranlarında konsantr peyniraltı suyu ilave ederek yoğurt üretmişlerdir. Konsantr peyniraltı suyu oranının artışına bağlı olarak yoğurtların pH değerlerinin düştüğünü, titrasyon asitliği değerlerinin ise arttığını belirlemişler ve bunun konsantr peyniraltı suyu ile birlikte laktoz oranının artmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise %2 ve 4 oranlarında laktuloz, fruktooligosakkarit ve galaktooligosakkarit ilave edilen süttler ile sadece süt

tozu ilave edilen süttlerden yoğurt üretilmiştir. Süttlerin inkübasyonu ve depolama süresince en düşük pH ile en yüksek laktik asit değerlerinin probiyotik içermeyen ve sadece süt tozu ilave edilen süttlerden üretilen yoğurt örneklerine ait olduğunu tespit edilmiştir [40]. Kalsiyum klorürün probiyotik yoğurt örneklerinin pH ve titrasyon asitliği değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli düzeye etki etmediği belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ). Singh ve Muthukumarappan [20] ile Kausik ve Arora [37] yaptıkları çalışmalarda kalsiyumla zenginleştirdikleri süttten ürettikleri yoğurtların pH ve titrasyon asitliği değerleri ile süte kalsiyum ilave etmeden ürettikleri kontrol yoğurtlarının pH ve titrasyon asitliği değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını tespit etmişlerdir. Depolama süresince laktik asit bakterilerinin aktivitesine [38] bağlı olarak probiyotik yoğurt örneklerinin pH değerleri azalırken titrasyon asitliği değerlerinin arttığı saptanmıştır (Tablo 1).

Probiyotik yoğurt örneklerinin serum ayrılması değerleri incelendiğinde, en yüksek serum ayrılması değerleri inülin ilave edilen süttten üretilen probiyotik yoğurt örneklerinde saptanırken, en düşük serum ayrılması değerlerinin peyniraltı suyu izolatu ilave edilen süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerine ait olduğu belirlenmiştir (Şekil 4c). Güven ve ark. [41] yaptıkları çalışmada, %1.0 inülin+%4.3 yağsız süt tozu, %2.0 inülin+%3.3 yağsız süt tozu ve %3.0 inülin+%2.3 yağsız süt tozu ilave ettikleri yağsız süttlerden kurumadde değeri yaklaşık %13.5 olan yoğurtlar üretmişler ve yoğurt örneklerindeki serum ayrılması değerlerini

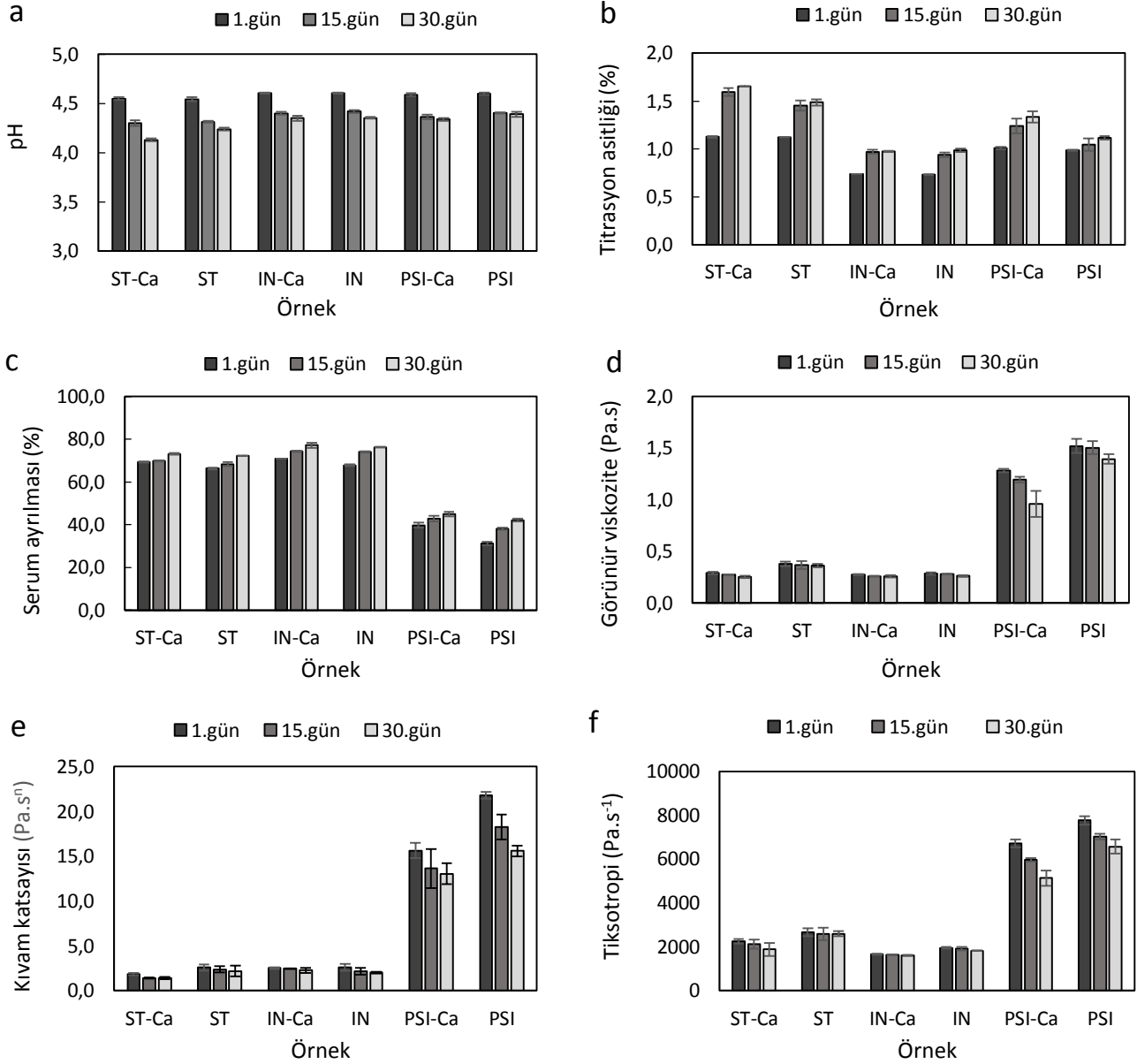
depolamanın 1. gününde sırasıyla 23.8 g/100 g yoğurt, 29.64 g/100 g ve 33.32 g/100 g olarak belirlemişlerdir. Sütün kurumaddesinin artırılmasında prebiyotik ve stabilizatörler gibi polisakkarit yapıdaki maddelerin kullanımının yoğurdun jel yapısı içinde yeniden düzenlemelere neden olduğu ve bunun da jel dengesini bozabildiği bildirilmiştir [42, 43]. Yapılan başka bir çalışmada tam yağlı süte %2 oranlarında yağsız süt tozu, sodyum kalsiyum kazeinat ve peyniraltı suyu protein konsantrati ilave edildikten sonra prebiyotik yoğurt üretilmiştir. Depolama süresince en düşük serum ayrılması değerlerinin peyniraltı suyu konsantresi ilave edilmiş sütte üretilen prebiyotik yoğurt örneklerine ait olduğu saptanmıştır [44]. Puvanenthiran ve ark. [45] süte eklenen peyniraltı suyu konsantrati miktarının artmasıyla birlikte yoğurt jelinin yoğunluğunun arttığını, jeli oluşturan pıhtı parçacıklarının boyutlarının ve gözeneklerin küçüldüğünü ve buna bağlı olarak da yoğurttan ayrılan serum miktarının azaldığını belirtmişlerdir. Ayrıca, yoğurt üretiminde kullanılan sütlerin protein oranının artmasına bağlı olarak yoğurtlarda serum ayrılmasının azaldığı bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada tespit edilen prebiyotik yoğurt örneklerinin serum ayrılması değerleri arasındaki farklılığın üretimde kullanılan sütlerin bileşimlerinin özellikle de protein içeriklerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kalsiyum ilavesinin prebiyotik yoğurt örneklerindeki serum ayrılması değerleri üzerine etkisi Tablo 1'de verilmiştir. Szajnar ve ark. [46] kalsiyum klorür ile zenginleştirilen sütlerden üretilen yoğurt örneklerinin ortalama serum ayrılması değerlerinin yaklaşık %45; kalsiyum klorür içermeyen sütlerden üretilen yoğurt örneklerinin ise ortalama serum ayrılması değerinin yaklaşık %37 olduğunu saptamışlardır. Başka bir çalışmada ise kalsiyum klorür ile zenginleştirilen ve zenginleştirilmeyen sütlerden üretilen prebiyotik fermente ürünlerin ortalama serum ayrılması değerlerinin sırasıyla %69.5 ve %63.1 olduğu belirlenmiştir [8]. Mevcut çalışmada belirlenen serum ayrılması değerleri yukarıda paylaşılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermiş ve diğer işlem koşullarıyla birlikte kalsiyum ilavesinin de serum ayrılması değerlerini etkileyebileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada prebiyotik yoğurt örneklerinin serum ayrılması değerlerinin depolama süresince arttığı tespit edilmiştir. Depolama süresince serum ayrılması değerlerinin düşmesinin yoğurtların titrasyon asitliği değerlerinin artması ve buna bağlı olarak proteinlerin yapısal olarak yeniden düzenlenmesiyle ilgili olabileceği bildirilmiştir [47].

Şekil 4'te görüldüğü üzere prebiyotik yoğurt örneklerine ait görünür viskozite, kıvam katsayısı ve tiksotropi

değerlerinin sırasıyla 0.25 ile 1.52 Pa.s, 1.38 ile 21.82 Pa.s<sup>n</sup> ve 1879.04 ile 7760.80 Pa.s<sup>-1</sup> arasında değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada, akışkanların Newtoniyen akış davranışa yönelik eğilimini gösteren akış davranış indeksi (n) değerlerinin 0.18 ile 0.46 arasında değiştiği belirlenmiştir. Üretilen prebiyotik yoğurt örneklerinin Newtoniyen olmayan (n<1) psödoplastik akış davranışı gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Prebiyotik yoğurt örneklerinin reolojik ölçümlerine ait çıkış ve iniş eğrilerindeki kayma gerilimi ve kayma hızı değerlerine üslü yasa modeli uygulanmış ve model için elde edilen regresyon katsayılarının 0.89 ile 0.96 arasında değiştiği saptanmıştır. Süte kalsiyum ilavesinin yoğurdun reolojik üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda; akış davranış indeksi değerlerinin prebiyotik yoğurt örneklerinde, 0.11-0.27 [17], yoğurt örneklerinde ise 0.31-0.39 [48] arasında değiştiği ve yoğurt örneklerinin üslü yasa modeline uyduğu belirtilmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçlarının literatürdeki benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Süt tozu ve inülin ile kurumaddesi artırılan sütlerden üretilen prebiyotik yoğurt örneklerinin görünür viskozite ve kıvam katsayısı değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı (p>0.05), peyniraltı suyu izolatu ile kurumadde değeri artırılan sütte üretilen prebiyotik yoğurt örneklerinin ise görünür viskozite, kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerinin diğer örneklere göre istatistiksel olarak yüksek olduğu saptanmıştır (p<0.05). Yoğurt üretiminde ısı işlem sırasında denatürasyona uğrayan  $\beta$ -laktoglobulinin yapısında bulunan kovalent disülfid bağları açılmaktadır. Fermantasyon süresince ortam asitliğinin yükselmesi sonucunda hidrofobik ve disülfid bağları yoluyla  $\beta$ -laktoglobulin/k-kazein kompleksleri oluşmaktadır. Söz konusu kompleksler sonucunda küçük gözenekli, daha sıkı ve homojen yapıda yoğurt jelleri elde edilebilmektedir [49, 50]. Yapılan bu çalışmada peyniraltı suyu protein izolatu ilave edilen sütlerden üretilen prebiyotik yoğurt örneklerinin yüksek görünür viskozite, kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerine sahip olması ısı işlem ve fermantasyon işlemleri sonucunda süt proteinlerinde meydana gelen değişikliklerle açıklanabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca, süt tozu ilave edilen sütlerden üretilen prebiyotik yoğurt örneklerinin tiksotropi değerlerinin kurumaddesi inülin ile artırılan sütlerden üretilen örneklere göre istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Süt tozu ilave edilen sütlerin protein oranının inülin ilave edilen sütlerden yüksek olmasının [51] ve ayrıca protein ile polisakkarit arasındaki etkileşimlerle oluşan komplekslerin çözünürlüğünün ve hidrasyon kapasitesinin düşük olmasının [52] söz konusu duruma neden olabileceği değerlendirilmiştir.



Şekil 4. Probiyotik yoğurt örneklerine ait pH (a), titrasyon asitliği (b), serum ayrılması (c), görünür viskozite (d), kıvam katsayısı (e), tiksotropi (f) değerleri. ST-Ca, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. ST, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. IN-Ca, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. IN, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. PSI-Ca, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. PSI, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

Figure 4. pH (a), titratable acidity (b), syneresis (c), apparent viscosity (d), consistency coefficient (e), thixotropy (f) values of probiotic yoghurt samples. St-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder and calcium chloride-added. St, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder. IN-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin and calcium chloride-added. IN, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin. PSI-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate and calcium chloride-added. PSI, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate. Error bars represent the standard deviation of means.

Kalsiyum klorür eklenerek kalsiyum açısından zenginleştirilen süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin görünür viskozite, kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerinin kalsiyum klorür ilave edilmeyen süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerine göre

düşük, akış davranış indeksi değerlerinin ise yüksek olduğu belirlenmiştir. Süte kalsiyum klorür eklenmesinin yoğurtların görünür viskozitesini artırması ve reolojik özelliklerini geliştirmesi beklenmekte ve bu durumun mekanizması kalsiyumun kazein miselinde ve serum

fazda bulunmasıyla ilişkilendirilerek şu şekilde açıklanmaktadır: Isıl işlem sırasında sütteki kalsiyumun çözünürlüğü azalmakta ve kalsiyum, kazein misellerinin yapısına koloidal kalsiyum fosfat olarak katılmaktadır. Sütün fermantasyonu sırasında asitliğin artmasına bağlı olarak koloidal kalsiyum fosfatın çözünürlüğü artmakta ve sütün serum fazında serbest halde daha fazla kalsiyum iyonu bulunmaktadır. Serum fazda bulunan serbest haldeki kalsiyum, kazein misellerinde bulunan glutamat ve aspartat aminoasitlerinin karboksil gruplarına bağlanmakta ve negatif yüklü kazein miselleri arasında bağ oluşması sağlanmaktadır. Ayrıca ısıl işlem peyniraltı suyu proteinlerinin denatüre olmasına neden olmaktadır.  $\beta$ -laktoglobulin ile  $\kappa$ -kazein,  $\alpha$ -laktalbumin ve diğer  $\beta$ -laktoglobulinler arasında yeni sülfidril bağları oluşmakta ve sonuç olarak sert yoğurt jelleri elde edilebilmektedir [53]. Bununla birlikte, kalsiyumun miktarı, farklı kalsiyum tuzlarının kullanılması, kalsiyumun ısıl işlemde önce veya sonra eklenmesi, sütün bileşimi ve süte uygulanan ısıl işlem sütteki kalsiyum-fosfat-kazein-peyniraltı suyu protein dengesi ile sütün yapısını etkilemekte ve söz konusu durum bu sütlerden üretilen yoğurtların fizikokimyasal özelliklerini değiştirebilmektedir [54, 55]. Koutina ve ark. [53] 30 mM kalsiyum klorür ilave ettikleri sütlerde 90°C'de 10 dakika ısıl işlem öncesi ve sonrasında kazein miselindeki ve serum fazdaki kalsiyum miktarını ölçmüşler ve pH 6.0'a ayarladıkları sütlerde ısıl işlem öncesinde kazein miselindeki ve serum fazdaki kalsiyum miktarını sırasıyla 24.0 ve 32.7 mM olarak belirlerken; yukarıdaki genel bilginin aksine ısıl işlem sonrasında kazein miselindeki kalsiyum miktarının azalarak 20.5 mM'a, serum fazdaki kalsiyum miktarının ise artarak 36.1 mM ulaştığını tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmaya benzer olarak yapılan bir çalışmada, jelatin, inülin ve beyaz şeker eklenen sültere ısıl işlemde (92°C'de 7 dakika) önce farklı oranlarda (1.00, 1.70, ve 2.37 mM) kalsiyum klorür ilave edilerek probiyotik yoğurt üretilmiş ve kalsiyum klorür eklenmeyen sülterden üretilen probiyotik yoğurtlar ile 1.00, 1.70 ve 2.37 mM kalsiyum klorür eklenerek üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin görünür viskozite değerlerinin sırasıyla 22.20 ile 20.52, 20.44 ve 19.14 cP olduğu belirlenmiştir. Süte kalsiyum klorür ilavesinin probiyotik yoğurtların viskozite değerlerinin düşmesine neden olduğu bildirilmiştir [10]. Başka bir çalışmada, sültere 80 mg/100 g farklı kalsiyum tuzları (kalsiyum karbonat, kalsiyum laktat, kalsiyum sitrat, kalsiyum bisglisinat, kalsiyum glukonat, kalsiyum klorür) ilave edilerek veya edilmeksizin ısıl işlem (72°C'de 15 s) uygulanmış ve 37°C'ye soğutulan sültere *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 veya *Lactobacillus rhamnosus* aşılanaarak fermente ürünler üretilmiştir. Her iki bakteri için de depolama süresince kalsiyum klorür ilave edilmeksizin üretilen ürünlerde jelin sertlik değerlerinin kalsiyum klorür ilave edilen sülterden üretilen örnekler göre yüksek olduğu belirlenmiştir [8]. Başka bir çalışmada, kalsiyum laktat eklenen sülterden üretilen meyveli yoğurt örneklerinin görünür viskozite ve kıvam katsayısı değerlerinin sırasıyla ortalama 1.75

Pa.s ve 23.2 Pa.s<sup>n</sup>; kalsiyum ilave edilmeyen sülterden üretilen kontrol örneklerinde ise bu değerlerin sırasıyla ortalama 1.67 Pa.s ve 40.6 Pa.s<sup>n</sup> olduğu belirlenmiştir. Meyveli yoğurt örneklerinin dinamik reolojik davranışları incelendiğinde ise, kalsiyum laktat ilavesinin meyveli yoğurt örneklerinin viskoelastik özelliklerini etkilemediği ve yoğurt jelinin oluşumunda benzer kimyasal bağların görev aldığı belirtilmiştir [17].

Probiyotik yoğurt örneklerine ait granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerleri Şekil 5'te verilmiştir. En yüksek granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerleri kurumadde miktarı peyniraltı suyu izolatu ile arttırılan sülterden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinde belirlenmiştir. Süt tozu ile kurumaddeyi arttırılan sülterden üretilen probiyotik yoğurt örneklerindeki granül sayısının kurumaddeyi inülin ilave edilerek arttırılan sülterden üretilen probiyotik yoğurt örneklerine göre yüksek olduğu saptanırken ( $p < 0.05$ ), granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerleri açısından örnekler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2). Jørgensen ve ark. [51] yoğurtta protein miktarı artışına bağlı olarak granül sayısının ve pürüzlülüğün arttığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise peyniraltı suyu proteini kazein oranının artmasına bağlı olarak yoğurtta granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerlerinin arttığı belirlenmiştir [30]. Bu bağlamda, mevcut çalışmanın sonuçlarının literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olduğu değerlendirilmiştir.

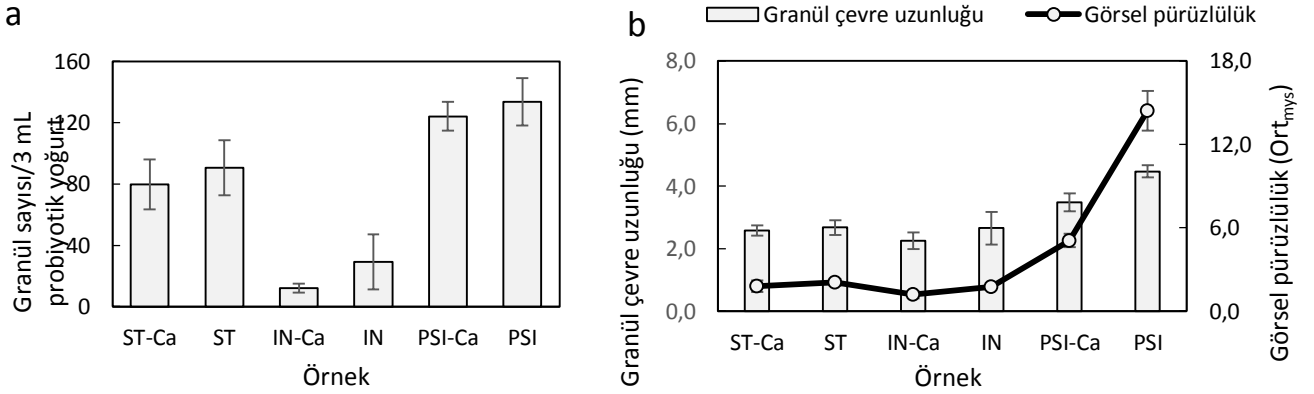
Kalsiyum klorür eklenerek kalsiyum açısından zenginleştirilen sülterden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerlerinin kalsiyum klorür ilave edilmeyen sülterden üretilen probiyotik yoğurt örneklerine göre düşük olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Kalsiyum klorür eklenen ve farklı yöntemlerle kalsiyum miktarı azaltılan sülterden yoğurt üretilen bir çalışmada, kalsiyum klorür miktarındaki artış veya azalma ile birlikte yoğurttaki granül sayısının arttığı saptanmıştır [10]. Süte kalsiyum miktarındaki artışın peyniraltı suyu proteinlerinin denatürasyonunu arttırarak kazein ile ilişkisinin desteklenmesine, kalsiyum miktarındaki azalışın ise koloidal kalsiyum fosfat çözünürlüğünün artmasına bağlı olarak kazein parçacıklarının sütün serum fazında serbest hale geçmesine neden olduğu ve söz konusu iki durumun da yoğurtta granül sayısının artmasında etkili olabileceği bildirilmiştir [10]. Bununla birlikte, Nguyen ve ark. [54] kazein ve peyniraltı suyu proteinlerin kalsiyuma yarışmalı olarak bağlandığını, ortamdaki peyniraltı suyu izolatu, sodyum kazeinat ve kalsiyum klorür miktarına bağlı olarak bağlanma şeklinin ve jel yapısının değiştiğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmadaki sonuçların diğer çalışmadan farklılık göstermesinin yoğurt üretimlerinde kullanılan sülterin bileşimlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Tablo 1. Probiyotik yoğurt örneklerinde depolama sürecinde belirlenen pH, titrasyon asitliği, serum ayrılması, görünür viskozite, kıvam katsayısı ve tiksotropi değerlerine ait ortalamaların varyans analiz ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Table 1. Variance analysis and Duncan Multiple Comparison Test results of the averages of pH, titratable acidity, syneresis, apparent viscosity, consistency coefficient and thixotropy values in probiotic yoghurt samples

Ana varyasyon kaynakları	pH	Titrasyon asitliği (%)	Serum ayrılması (%)	Görünür viskozite (Pa.s)	Kıvam katsayısı (Pa.s <sup>n</sup> )	Tiksotropi (Pa.s <sup>-1</sup> )
Kurumadde artırımında kullanılan tozlar	***	***	***	***	***	***
Süt tozu	4.35±0.16b	1.40±0.22a	69.86±2.40b	0.32±0.05b	2.33±0.28b	2349.08±336.05b
İnülin	4.46±0.11a	0.89±0.12c	73.47±3.37a	0.27±0.01b	1.97±0.53b	1762.66±145.43c
Peyniraltı suyu izolatu	4.45±0.11a	1.13±0.13b	39.82±4.53c	1.31±0.20a	16.32±3.10a	6528.01±840.05a
Kalsiyum ilavesi	-	-	***	***	***	***
Var	4.40±0.15a	1.13±0.30a	62.48±14.77a	0.56±0.43b	6.02±5.96b	3218.64±2031.73b
Yok	4.43±0.12a	1.12±0.23a	59.62±16.40b	0.71±0.55a	7.73±7.81a	3874.53±2332.86a
Depolama	***	***	***	-	***	***
1. gün	4.58±0.03a	0.95±0.17c	57.54±16.61c	0.66±0.55a	7.83±8.26a	3833.15±2556.97a
15. gün	4.37±0.05b	1.19±0.25b	61.28±14.94b	0.64±0.51a	6.72±6.70b	3541.79±2134.49b
30. gün	4.30±0.09c	1.25±0.27a	64.32±15.47a	0.60±0.46a	6.08±6.15b	3264.82±1988.05c

-İstatistiksel olarak önemsiz, \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 düzeyinde önemlidir. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak p<0.05 düzeyinde önemliliği belirtmektedir.



Şekil 5. Probiyotik yoğurt örneklerine ait granül sayısı (a), granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerleri (b). ST-Ca, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. ST, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. IN-Ca, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. IN, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. PSI-Ca, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt. PSI, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

Figure 5. Number of grain (a), perimeter of grain and visual roughness (b) values of probiotic yoghurt samples. St-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder and calcium chloride-added. St, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder. IN-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin and calcium chloride-added. IN, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin. PSI-Ca, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate and calcium chloride-added. PSI, probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate. Error bars represent the standard deviations of means.

### Probiyotik Yoğurt Örneklerinin Duyusal Özellikleri

Probiyotik yoğurt örneklerine ait görünüş, tat, yapı ve genel beğeni puanları Şekil 6'de verilmiştir. En yüksek görünüş ve tat puanları depolamanın 1. gününde süt tozu ile kurumaddesi artırılan ve kalsiyum açısından zenginleştirilen süttten üretilen probiyotik yoğurt örneklerinde belirlenmiştir. Peyniraltı suyu izolatu ilave edilen süttten üretilen probiyotik yoğurt örneğinin yapı ve genel beğeni puanlarının depolamanın tüm günleri için diğer örneklerden düşük olduğu tespit edilmiştir. Söz

konusu örneğin granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerlerinin yüksek olmasının yapı puanlarını olumsuz etkilemiş olabileceği değerlendirilmiştir.

Probiyotik yoğurt örneklerinin görünüş, tat, yapı ve genel beğeni puanlarının süte kalsiyum klorür ilavesinden istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilenmediği belirlenmiştir (p>0.05) (Tablo 3). Bununla birlikte, kalsiyum klorür ilavesi yapılan süttlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerinde görünüş, yapı ve genel

beğeni puanlarının kalsiyum klorür ilave edilmeyen sütlerden üretilen yoğurt örneklerinden yüksek olduğu, söz konusu durumun kalsiyum ilavesinin probiyotik yoğurt örneklerindeki granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerlerini azaltmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Santillán-Urquiza ve ark. [48] yaptıkları çalışmada kalsiyum açısından zenginleştirilen sütlerden üretilen yoğurtlar ile kalsiyum ilave edilmeyen süttten üretilen kontrol yoğurtlarının

tüketici tarafından genel kabul edilebilirlik puanlarının benzer olduğunu; Singh ve Muthukumarappan [20] ise süte kalsiyum ilavesinin meyveli yoğurtların tat, yapı, görünüş ve kabul edilebilirlik puanları üzerine istatistiksel açıdan önemli düzeyde etki etmediğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada probiyotik yoğurt örneklerinin depolama süresince görünüş, tat, yapı ve genel beğeni puanlarının azaldığı tespit edilmiştir.

Tablo 2. Probiyotik yoğurt örneklerindeki granül sayısı, granül çevre uzunluğu ve görsel pürüzlülük değerlerine ait ortalamaların varyans analiz ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

**Table 2. Variance analysis and Duncan Multiple Comparison Test results of the averages of grains number, grain perimeter and visual roughness values in probiotic yoghurt samples**

Ana varyasyon kaynakları	Granül sayısı/3 mL yoğurt	Granül çevre uzunluğu (mm)	Görsel pürüzlülük (Ort <sub>mys</sub> )
Kurumadde artırımında kullanılan tozlar	***	***	***
Süt tozu	85.08±17.98b	2.63±0.21b	1.94±0.36b
İnülin	20.67±11.99c	2.46±0.46b	1.46±0.34b
Peyniraltı suyu izolatu	128.83±13.61a	3.98±0.55a	9.76±4.79a
Kalsiyum ilavesi	*	***	***
Var	71.94±47.42b	2.78±0.57b	2.69±1.76b
Yok	84.44±45.34a	3.27±0.92a	6.08±5.97a

-İstatistiksel olarak önemsiz, \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 düzeyinde önemlidir. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak p<0.05 düzeyinde önemliliği belirtmektedir.

Tablo 3. Probiyotik yoğurt örneklerinde depolama sürecinde belirlenen görünüş, tat, yapı ve genel beğeni puanlarına ait ortalamaların varyans analiz ve Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

**Table 3. Variance analysis and Duncan Multiple Comparison Test results of the averages of appearance, taste, texture and overall appreciation scores in probiotic yoghurt samples**

Ana varyasyon kaynakları	Görünüş puanı (Tam puan=5)	Tat puanı (Tam puan=5)	Yapı puanı (Tam puan=5)	Genel beğeni puanı (Tam puan=5)
Kurumadde artırımında kullanılan tozlar	*	-	***	-
Süt tozu	3.62±0.64a	2.85±0.63a	3.07±0.64a	2.67±1.13a
İnülin	3.41±0.53ba	2.80±0.54a	3.10±0.51a	2.71±0.88a
Peyniraltı suyu izolatu	3.12±0.88b	2.65±0.54a	2.36±0.70b	2.26±1.22a
Kalsiyum ilavesi	-	-	-	-
Var	3.54±0.60a	2.77±0.53a	2.95±0.54a	2.65±1.09a
Yok	3.23±0.81a	2.76±0.61a	2.73±0.84a	2.44±1.11a
Depolama	***	***	***	***
1. gün	3.89±0.75a	3.36±0.35a	3.26±0.84a	3.00±1.03a
15. gün	3.33±0.48b	2.62±0.30b	2.69±0.49b	2.52±0.97b
30. gün	2.93±0.57c	2.32±0.44c	2.58±0.55b	2.12±1.11b

-İstatistiksel olarak önemsiz, \* p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 düzeyinde önemlidir. Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak p<0.05 düzeyinde önemliliği belirtmektedir.

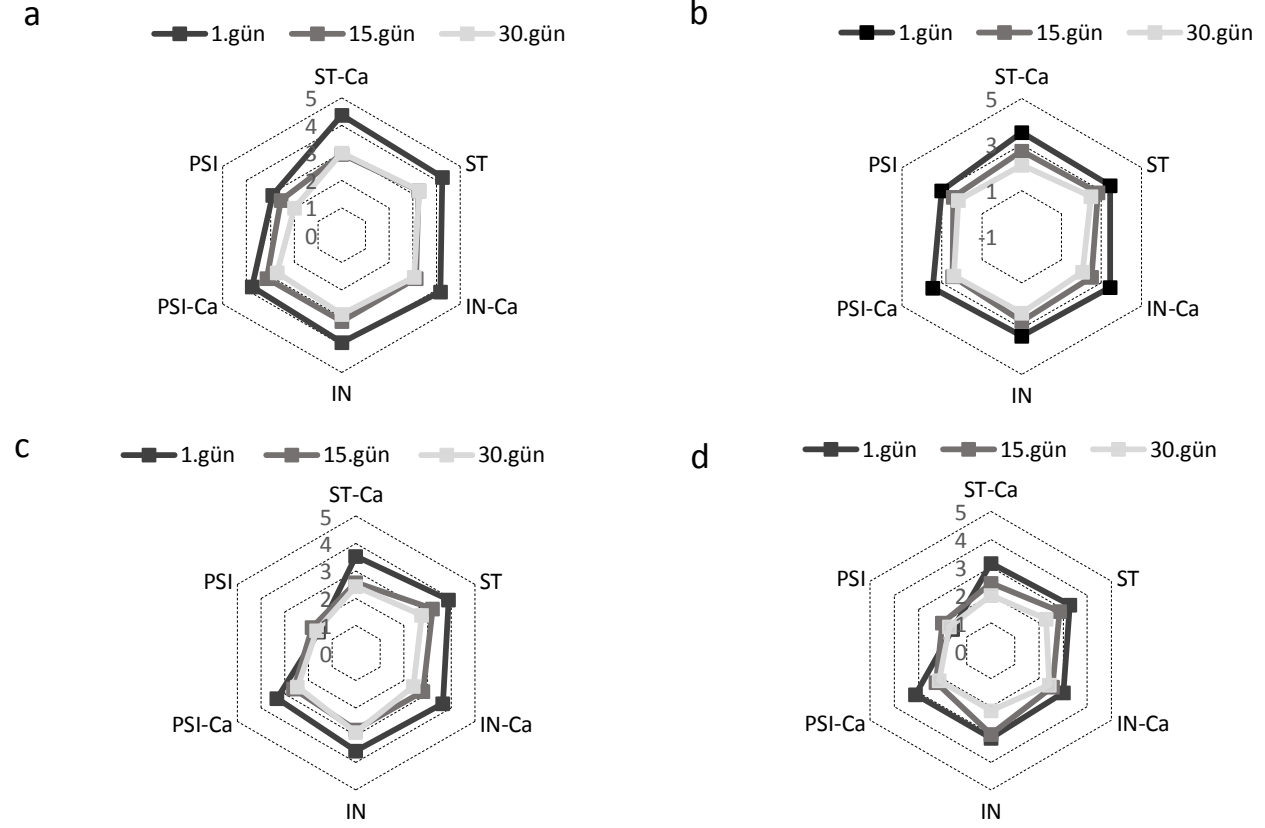
### Probiyotik Yoğurt Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Probiyotik yoğurt örneklerindeki *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. paracasei* sayılarının depolama süresince sırasıyla 7.67-9.23-, 6.14-8.26-ve 7.71-8.98 log kob/g arasında değiştiği belirlenmiştir (Şekil 7). Kurumadde artırımında kullanılan süt tozu, inülin ve peyniraltı suyu protein izolatu probiyotik yoğurt örneklerindeki *S. thermophilus* ve *L. paracasei* sayılarını istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilemediği (p>0.05); *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısının ise süt tozu eklenen süttten üretilen probiyotik yoğurt örneklerinde diğer örneklere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Glusac ve ark. [56] ile Annutes ve ark. [57] yaptıkları çalışmalarda süte peyniraltı suyu

konsantratu ekledikleri süttten yoğurt üretmişler ve peyniraltı suyu konsantratu ilavesinin yoğurt örneklerindeki *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayılarını değiştirmediğini bildirmişlerdir. Canbulat ve Ozcan [58] yaptıkları çalışmada inülin ekledikleri sütlerden ürettikleri yoğurtlarda *Lactobacillus rhamnosus* sayısı üzerine inülinin istatistiksel olarak önemli düzeyde etkisinin olmadığını belirlemişlerdir. Helal ve ark. [52] %1, 2 ve 3 oranında inülin ekledikleri sütlerden ürettikleri yoğurtlarda inülinin *S. thermophilus* canlılığı üzerine istatistiksel olarak etki etmediğini, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* canlılığının %1 ve 2 oranlarında inülin ilavesinden olumlu, %3 inülin ilavesinden ise olumsuz etkilendiğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada kalsiyum klorür ilavesi ile kalsiyum açısından zenginleştirilen sütlerden üretilen probiyotik

yoğurt örneklerindeki *S. thermophilus* sayısının kalsiyum klorür ilave edilmeyen sütlerden üretilen probiyotik yoğurt örneklerine göre düşük olduğu saptanırken, *L.*

*delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. paracasei* canlılığının kalsiyum klorür ilavesinden etkilenmediği tespit edilmiştir.

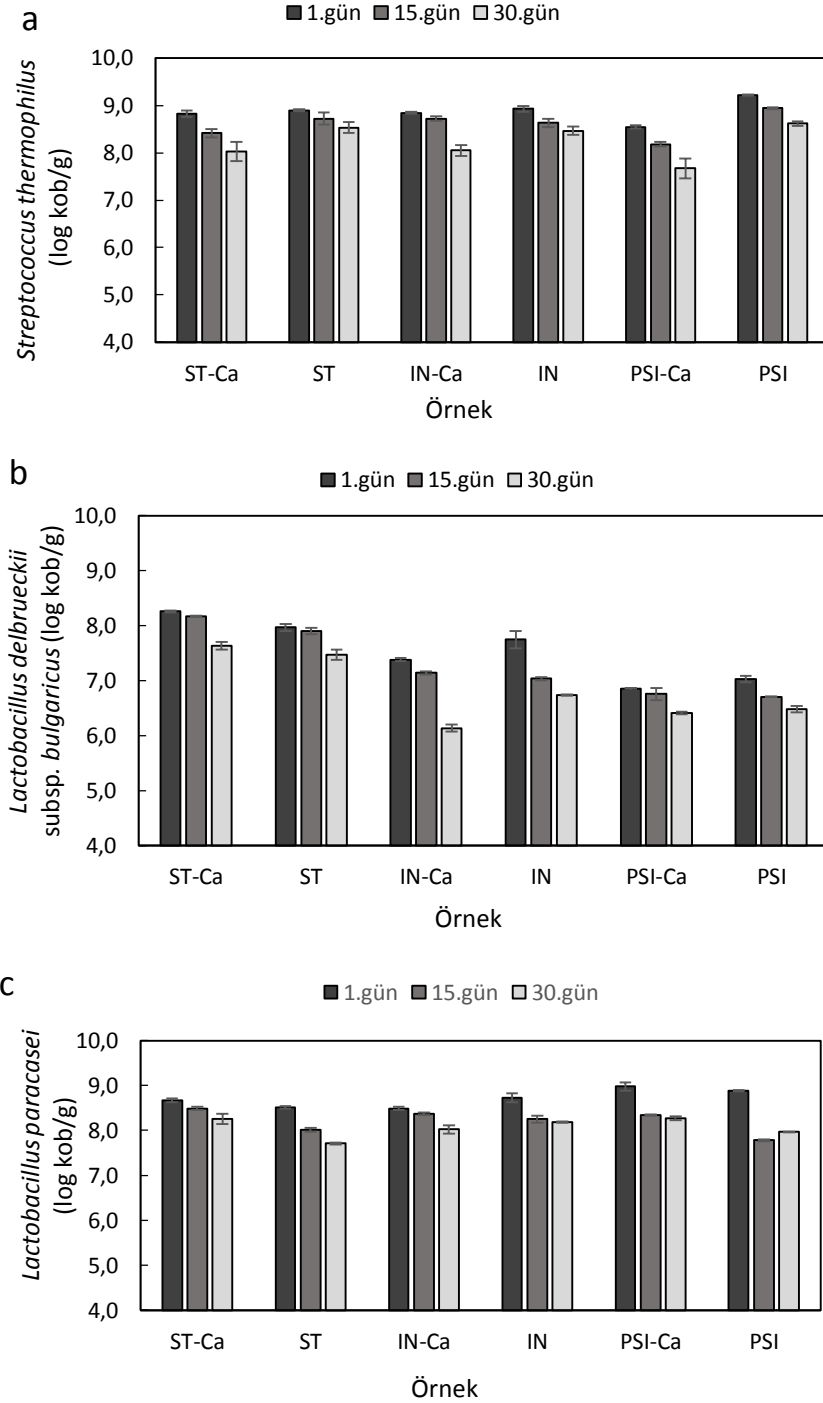


Şekil 6. Probiyotik yoğurt örneklerine ait görünüş (a), tat (b), yapı (c) ve genel beğeni puanları (d). ST-Ca; süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen sütten üretilen probiyotik yoğurt, ST, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. IN-Ca, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen sütten üretilen probiyotik yoğurt. IN, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. PSI-Ca, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen sütten üretilen probiyotik yoğurt. PSI, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

**Figure 6. The appearance (a), taste (b), texture (c) and overall appreciation (d) scores of probiotic yoghurt samples. St-Ca; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder and calcium chloride-added. St; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder. IN-Ca; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin and calcium chloride-added. IN; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin. PSI-Ca; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate and calcium chloride-added. PSI; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate. Error bars represent the standard deviations of means.**

Farklı bir çalışmada, kalsiyum klorür ilave edilen ve edilmeyen sütlerden *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 ve *Lactobacillus rhamnosus* ile fermente içecekler üretilmiştir. Kalsiyum klorür ilavesinin 21 günlük depolama süresinin sonunda probiyotik bakterilerinin gelişimini etkilemediği saptanmıştır [8]. Başka bir çalışmada, 400, 600 veya 800 mg/100 g düzeylerinde kalsiyum laktik ilave edilen ve sukroz ile mısır nişastası içeren sütlerden yoğurt üretilmiş ve üretilen yoğurtlardaki laktik asit bakteri sayısının kalsiyum laktik içermeyen kontrol örnekleri ile benzer olduğu tespit edilmiştir [59]. Bununla birlikte Kaushik ve Aroara [37] yaptıkları çalışmada, süte kalsiyum fosfat ilavesinin *S. thermophilus* canlılığını olumsuz etkilediğini belirlemişler ve söz konusu durumun kalsiyum ilave edilen sütlerden

üretilen yoğurtlarda jel oluşumunun daha geç olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada probiyotik yoğurt örneklerindeki *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *L. paracasei* sayılarının depolama süresince düştüğü tespit edilmiştir. Depolama süresince artan asitlikle birlikte laktik asit bakterilerinin sayısında azalma olabileceği değerlendirilmiştir [60].



Şekil 7 Probiyotik yoğurt örneklerindeki *Streptococcus thermophilus* sayısı (a), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısı (b) ve *Lactobacillus paracasei* sayısı (c). ST, süt tozu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. IN-Ca, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süten üretilen probiyotik yoğurt. IN, inülin kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. PSI-Ca, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan ve kalsiyum klorür eklenen süten üretilen probiyotik yoğurt. PSI, peyniraltı suyu izolatu kullanılarak kurumaddesi artırılan süt ile üretilen probiyotik yoğurt. Hata çubukları standart sapma değerlerini göstermektedir.

Figure 7. Enumeration of *Streptococcus thermophilus* (a), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (b) and *Lactobacillus paracasei* (c) in probiotic yoghurt samples. St-Ca; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder, and calcium chloride-added, St; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with milk powder. IN-Ca; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin and calcium chloride-added. IN; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with inulin. PSI-Ca; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate and calcium chloride-added. PSI; probiotic yoghurt produced from milk whose dry matter was increased with whey isolate. Error bars represent the standard deviations of means.



## SONUÇ

Yapılan bu çalışmada, süt tozu, inülin veya peyniraltı suyu izolatu kullanılarak üretilen probiyotik yoğurt örneklerinin birbirlerinden farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Peyniraltı suyu izolatinin probiyotik yoğurt örneklerinin reolojik özelliklerini geliştirdiği saptanırken, görsel nitelikleri ile duyuşal özellik olarak yapı puanlarını olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Sütün kurumadde artırımında süt tozu, inülin veya peyniraltı suyu izolatu kullanımının probiyotik yoğurt örneklerinin mikrobiyolojik özellikleri üzerine istatistiksel olarak etki etmediği belirlenmiştir ( $p>0.05$ ). Süte kalsiyum klorür ilavesinin probiyotik yoğurtların görsel nitelikleri ile duyuşal ve mikrobiyolojik özellikleri açısından herhangi bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Kalsiyum klorür ilavesinin probiyotik yoğurt örneklerinin serum ayrılması, görünür viskozite, kıvam katsayısı ve tiksotropi değerleri üzerine etkisinin olabileceği değerlendirilmekle birlikte konu ile ilgili yapılacak çalışmalarda miktar da dikkate alınarak farklı kalsiyum tuzları ilave edilmiş sütlerden üretilen probiyotik yoğurtların özelliklerinin belirlenmesine ve süte kalsiyum ilavesinin etkisinin net olarak ortaya konmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Sonuç olarak, konu ile ilgili olarak bundan sonra yapılacak çalışmalarda süte peyniraltı suyu izolatu ile kalsiyum klorür ilavesinin optimizasyonunun gerçekleştirilerek reolojik ve görsel özellikleri geliştirilmiş probiyotik yoğurt üretilmesinin mümkün olacağı değerlendirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Özkaya, Ö.Ş. (2021). Yaşam kalitesi ve fonksiyonel besinler. *Fenerbahçe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(1), 62-68.
- [2] Türkmen, N., Gürsoy, A. (2017). Fonksiyonel Dondurma. *Akademik Gıda*, 15(4), 386-395.
- [3] Jørgensen, C.E., Abrahamsen, R.K., Rukke, E.O., Johansen, A.G., Schüller, R.B., Skeie, S.B. (2015). Improving the structure and rheology of high protein, low fat yoghurt with undenatured whey proteins. *International Dairy Journal*, 47, 6-18.
- [4] Le Roy, C.I., Kurilshikov, A., Leeming, E.R., Visconti, A., Bowyer, R.C., Menni, C., Falchi, M., Koutnikova, H., Veiga, P., Zhernakova, A., Derrien, M., Spector, T.D. (2022). Yoghurt consumption is associated with changes in the composition of the human gut microbiome and metabolome. *BMC Microbiology*, 22(1), 1-12.
- [5] Sarkar, S. (2019). Potentiality of probiotic yoghurt as a functional food—a review. *Nutrition & Food Science*, 49(2), 182-202.
- [6] Aspray, T.J. (2017). Calcium: Basic nutritional aspects. In *Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals*, Edited by Collins, J. Academic Press, Florida, ABD, 45p.
- [7] Özunal, A., Alim, N.E. (2022). Menopozal dönemde görülen osteoporozda kalsiyum ve D vitamininin rolü. *Türkiye Sağlık Araştırmaları Dergisi*, 3(1), 46-55.
- [8] Szajnar, K., Znamirowska, A., Kuźniar, P. (2020). Sensory and textural properties of fermented milk with viability of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 and increased calcium concentration. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 582-598.
- [9] Deeth, H.C., Lewis, M.J. (2015). Practical consequences of calcium addition to and removal from milk and milk products. *International Journal of Dairy Technology*, 68(1), 1-10.
- [10] Ramasubramanian, L., Restuccia, C., Deeth, H.C. (2008). Effect of calcium on the physical properties of stirred probiotic yogurt. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4164-4175.
- [11] de Souza, W.F.C., do Amaral, C.R.S., da Silva Bernardino, P.D.L. (2021). The addition of skim milk powder and dairy cream influences the physicochemical properties and the sensory acceptance of concentrated Greek-style yogurt. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 24, 100349.
- [12] Atallah, A.A., Osman, A., Sitohy, M., Gemiel, D.G., El-Garhy, O.H., Azab, I.H.E., Fahim, N.H., Abdelmoniem, A.M., Mehana, A.E., Imbabi, T.A. (2021). Physiological performance of rabbits administered buffalo milk yogurts enriched with whey protein concentrate, calcium caseinate or spirulina platensis. *Foods*, 10(10), 2493.
- [13] Heydari, S., Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Mohammadifar, M.A., Ezzatpanah, H. (2011). Biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic yogurt containing various prebiotic compounds. *Italian Journal of Food Science*, 2(23), 153-163.
- [14] Yıldız-Akgül, F. (2018). Enhancement of torba yoghurt with whey protein isolates. *International Journal of Dairy Technology*, 71(4), 898-905.
- [15] Kamel, D.G., Hammam, A.R., Alsaleem, K.A., Osman, D.M. (2021). Addition of inulin to probiotic yogurt: Viability of probiotic bacteria (*Bifidobacterium bifidum*) and sensory characteristics. *Food Science & Nutrition*, 9(3), 1743-1749.
- [16] Gurram, S., Jha, D.K., Shah, D.S., Kshirsagar, M.M., Amin, P.D. (2021). Insights on the critical parameters affecting the probiotic viability during stabilization process and formulation development. *AAPS Pharmacology Science and Technology*, 22(5), 1-22.
- [17] Shori, A.B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1-8.
- [18] Araújo, N.G., Barbosa, I.M., Lima, T.L.S., Moreira, R.T., Cardarelli, H.R. (2022). Development and characterization of lactose-free probiotic goat milk beverage with bioactive rich jambo pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 1-13.
- [19] Alizadeh Khaledabad, M., Ghasempour, Z., Moghaddas Kia, E., Rezazad Bari, M., Zarrin, R. (2020). Probiotic yoghurt functionalised with microalgae and Zedo gum: chemical, microbiological, rheological and sensory characteristics. *International Journal of Dairy Technology*, 73(1), 67-75.
- [20] Singh, G., Muthukumarappan, K. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical and

- rheological characteristics of fruit yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 41(7), 1145-1152.
- [21] Kessler, H.G. (2002). Food and Bioprocess Engineering: Dairy Technology. Freising: Verlag A. Kessler, Munchen, Germany.
- [22] AOAC. (2000). *Solids (total) in milk. method no. 925.23*. In W. Horowitz (Ed.). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). (p. 10). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- [23] AOAC. (2000). *Protein nitrogen content of milk. method no. 991.22*. In W. Horowitz (Ed.). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). (pp. 13-14). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- [24] AOAC. (2000). *Fat content of raw and pasteurized whole milk. method no. 2000.18*. In W. Horowitz (Ed.). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). (pp. 21-23). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- [25] AOAC. (2000). *Ash of milk. method no. 945.46*. In W. Horowitz (Ed.). Official methods of analysis of AOAC International (17th ed.). (p. 10). Gaithersburg, MD, USA: AOAC International.
- [26] Anonymous. 1991. Yoghurt-Determination of titratable acidity. International IDF Standard. 150. Belgium.
- [27] Anonymous. 1987. Milk, cream and evaporated milk. Determination of total solids content. Reference Method. International IDF Standard. 21B. Belgium.
- [28] Anonymous. 1986. Milk determination of nitrogen content (Kjeldahl Method) and calculation of crude protein content. International IDF Standard. 20A. Belgium.
- [29] Arango, O., Trujillo, A.J., Castillo, M. (2020). Influence of fat substitution by inulin on fermentation process and physical properties of set yoghurt evaluated by an optical sensor. *Food and Bioprocess Processing*, 124, 24-32.
- [30] Küçükçetin, A., Weidendorfer, K., & Hinrichs, J. (2009). Graininess and roughness of stirred yoghurt as influenced by processing. *International Dairy Journal*, 19(1), 50-55.
- [31] Küçükçetin, A. (2008). Effect of heat treatment and casein to whey protein ratio of skim milk on graininess and roughness of stirred yoghurt. *Food Research International*, 41(2), 165-171.
- [32] Koksoy, A., Kilic, M. (2004). Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 593-600.
- [33] Tharmaraj, N., Shah, N.P. (2003). Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2288-2296.
- [34] Mkaadem, W., Belguith, K., Semmar, N., Zid, M. B., ElHatmi, H., Boudhrioua, N. (2022). Effect of process parameters on quality attributes of Lben: Correlation between physicochemical and sensory properties. *LWT-Food Science and Technology*, 155, 112987.
- [35] Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O., Gürbüz., F. (1987). Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. No: 1021. 381 ss. Ankara.
- [36] Anonim. 2009. Türk Gıda Kodeksi-Fermente Süt Ürünleri Tebliği. Tebliğ No: 2009/25.T.C. Resmi Gazete 16.02.2009 tarih ve 27143 sayılı. Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü. Ankara.
- [37] Kaushik, R., Arora, S. (2017). Effect of calcium and vitamin D<sub>2</sub> fortification on physical, microbial, rheological and sensory characteristics of yoghurt. *International Food Research Journal*, 24(4), 1744-1752.
- [38] Tiwari, S., Kavitate, D., Devi, P. B., Shetty, P.H. (2021). Bacterial exopolysaccharides for improvement of technological, functional and rheological properties of yoghurt. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1585-1595.
- [39] Rashid, A.A., Huma, N., Saeed, S., Shahzad, K., Ahmad, I., Ahmad, I., Nawaz, S., Imran, M. (2019). Characterization and development of yogurt from concentrated whey. *International Journal of Food Engineering*, 3, 1-7.
- [40] Delgado-Fernández, P., Corzo, N., Olano, A., Hernández-Hernández, O., Moreno, F.J. (2019). Effect of selected prebiotics on the growth of lactic acid bacteria and physicochemical properties of yoghurts. *International Dairy Journal*, 89, 77-85.
- [41] Guven, M., Yasar, K., Karaca, O.B., Hayaloglu, A.A. (2005). The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type low-fat yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 58(3), 180-184.
- [42] Aghajani, A.R., Pourahmad, R., Mahdavi Adeli, H.R. (2014). The effect of oligofructose, lactulose and inulin mixture as prebiotic on physicochemical properties of synbiotic yogurt. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 4(2), 33-40.
- [43] Grinberg, V.Y., Tolstoguzov, V.B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11(2), 145-158.
- [44] Akalın, A.S., Unal, G., Dinkci, N. Hayaloglu, A.A. (2012). Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 95(7), 3617-3628.
- [45] Puvanenthiran, A., Williams, R.P.W., Augustin, M.A. (2002). Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, 12(4), 383-391.
- [46] Szajnar, K., Znamirowska, A., Kalicka, D., Zagula, G. (2017). Fortification of yoghurts with calcium compounds. *Journal of Elementology*, 22(3), 869-879.
- [47] Mumtaz, S., Rehman, S.U., Huma, N., Jamil, A., Nawaz, H. (2008). Xylooligosaccharide enriched yoghurt: physicochemical and sensory evaluation. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(4), 566-569.
- [48] Santillán-Urquiza, E., Méndez-Rojas, M.Á., Vélez-Ruiz, J.F. (2017). Fortification of yogurt with nano

- and micro sized calcium, iron and zinc, effect on the physicochemical and rheological properties. *LWT-Food Science and Technology*, 80, 462-469.
- [49] Krzeminski, A., Großhable, K., Hinrichs, J. (2011). Structural properties of stirred yoghurt as influenced by whey proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 2134-2140.
- [50] Donato, L., Guyomarc'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein kappa-casein complexes in heated skim milk—A review. *Dairy Science and Technology*, 89(1), 3-29.
- [51] Jørgensen, C.E., Abrahamsen, R.K., Rukke, E.O., Hoffmann, T.K., Johansen, A.G., Skeie, S.B. (2019). Processing of high-protein yoghurt—A review. *International Dairy Journal*, 88, 42-59.
- [52] Helal, A., Rashid, N., Dyab, M., Otaibi, M., & Alnemr, T. (2018). Enhanced functional, sensory, microbial and texture properties of low-fat set yogurt supplemented with high-density inulin. *Journal of Food Processing & Beverages*, 6(1), 1-11.
- [53] Koutina, G., Christensen, M., Bakman, M., Andersen, U., Skibsted, L.H. (2016). Calcium induced skim-milk gelation during heating as affected by pH. *Dairy Science & Technology*, 96(1), 79-93.
- [54] Nguyen, B.T., Balakrishnan, G., Jacqueline, B., Nicolai, T., Chassenieux, C., Schmitt, C., Bovetto, L. (2016). Inhibition and promotion of heat-induced gelation of whey proteins in the presence of calcium by addition of sodium caseinate. *Biomacromolecules*, 17(11), 3800-3807.
- [55] Lin, L., Wong, M., Deeth, H.C., Oh, H.E. (2018). Calcium-induced skim milk gels using different calcium salts. *Food Chemistry*, 245, 97-103.
- [56] Glušac, J., Stijepić, M., Đurđević-Milošević, D., Milanović, S., Kanurić, K., Vukić, V. (2015). Growth and viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in traditional yoghurt enriched by honey and whey protein concentrate. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16(3), 249-255.
- [57] Antunes, A.E., Cazetto, T.F., Bolini, H.M. (2005). Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, 58(3), 169-173.
- [58] Canbulat, Z., Ozcan, T. (2015). Effects of short-chain and long-chain inulin on the quality of probiotic yogurt containing *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 1251-1260.
- [59] Pachekrepapol, U., Waranich, J., Kamlangeak, P. (2018). Impact of calcium fortification on physicochemical, rheological and microbiological properties of stirred yogurts blended with banana purée. *Burapha Science Journal*, 23(1), 79-91.
- [60] Çomak Göçer, E.M., Ergin, F., Arslan Aşçı, A., Küçükçetin, A. (2016). Farklı inkübasyon sıcaklığı ile inkübasyon sonlandırma pH'sının probiyotik yoğurdun fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi. *Akademik Gıda*, 14(4), 341-350.

## Doğal Killerin Model Yağın Renk ve Fiziko-kimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi

Didem Demir , Zeynep Gün , Emin Yılmaz  

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 17020, Çanakkale

Geliş Tarihi (Received): 30.11.2021, Kabul Tarihi (Accepted): 25.04.2022

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [eyilmaz@comu.edu.tr](mailto:eyilmaz@comu.edu.tr) (E. Yılmaz)

☎ 0286 218 00 18 / 20054 📠 0286 218 05 41

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, beta karoten ve klorofil katılarak hazırlanan model yağdan bu pigmentlerin verdiği rengin uzaklaştırılma kapasitelerinin 9 doğal kil ve 2 ticari ağartma toprağı (T.A.T.) açısından karşılaştırılmasıdır. Halloysit, zeolit, bentonit, sepiyolit, diatom toprağı, Magnesol XL, kaolin, montmorillonit ve perlit model yağa ağırlıkça %0.5 oranında katılmış ve 80°C'de 30 dakika karıştırmayı takiben yağ filtre edilerek, aletsel renk, yağ kaybı, serbest yağ asitliği (SYA), asit sayısı ve peroksit sayısı (PS) tespit edilmiştir. Beta karoten rengi için kontrole göre toplam renk farkı ( $\Delta E$ ) en yüksek örnekler 2.3, 2.1 ve 1.8 değerleriyle T.A.T.-1, T.A.T.-2 ve halloysit ile muamele edilmiş örneklerde ölçülmüştür. Bu grup örneklerde ağırlık kaybı en az %22.1 ile bentonit ve en fazla %45.3 ile perlit muamelelerinde görülmüştür. Ayrıca serbest yağ asitliğini en fazla düşüren (%7.7) Magnesol XL kili olmuştur. Benzer şekilde T.A.T.-1 ve sepiyolit ile muamele edilmiş örneklerde PS değeri sıfır iken kaolin ile muamelede 79.1 meqO<sub>2</sub>/kg yağ olarak ölçülmüştür. Bu grupta sepiyolit ve Magnesol XL en başarılı sonuçları sağlamıştır. Klorofil katılan örneklerde yeşil renk en başarılı olarak sepiyolit tarafından ( $\Delta E=6.2$ ) uzaklaştırılmıştır. Bu grup örneklerde ağırlık kaybı en fazla perlit (%52.9), en az bentonit (%23.5) ile muamele edilmiş örneklerde ölçülmüştür. SYA en fazla Magnesol XL (%5.9), ve PS en fazla T.A.T.-2 ve zeolit (0 meqO<sub>2</sub>/kg yağ) tarafından azaltılmış olup bentonit ve Magnesol XL örnekleri bu grupta öne çıkmıştır. Daha önce bu amaçla çalışılmamış olan halloysit ile genelde iyi sonuçlar sağlamıştır. Tüm killer için asit aktivasyonu, boyut küçültme, nano boyutta kil olarak hazırlama ve sonikasyon gibi modifikasyon teknikleri önerilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Doğal kil, Model yağ, Beta karoten, Klorofil, Adsorpsiyon

### Effect of Natural Clays on Color and Physico-Chemical Properties of Model Oil

#### ABSTRACT

The objective of this study was to compare the color removal capacities of 9 natural clays and 2 commercial bleaching earths (C.B.E.) for beta carotene and chlorophyll pigments added model oil. Halloysite, zeolite, bentonite, sepiolite, diatom earth, Magnesol XL, kaolin, montmorillonite and perlite were added at 0.5% weight ratio into model oil and mixed for 30 min at 80°C, before filtering and analyzing for instrumental color, oil loss, free fatty acidity, acid number and peroxide values. The total color difference ( $\Delta E$ ) for beta carotene were highest with 2.3, 2.1, and 1.8 for C.B.E.-1, C.B.E.-2 and halloysite treated samples. In this group, weight loss was minimum at 22.1% for bentonite, and maximum at 45.3% for perlite treatments. Also, free fatty acidity (FFA) was reduced at most (7.7%) with Magnesol XL treatment. Similarly, C.B.E.-1 and sepiolite treated samples yielded 0, and kaolin treated sample yielded 79.1 meqO<sub>2</sub>/kg oil peroxide values (PV). In this group, sepiolite and Magnesol XL were the most successful clays. In chlorophyll added samples, the color was most successfully removed by sepiolite ( $\Delta E=6.2$ ). The maximum weight loss (52.9%) was with perlite, and the minimum was (23.5%) with bentonite treated samples. FFA was reduced at most (5.9%) with Magnesol XL, and PV was lowered at most (0 meqO<sub>2</sub>/kg oil) with C.B.E.-2 and zeolite clays. In this group,

bentonite and Magnesol XL were most successful. Halloysite, which was not studied for this purpose, had generally good results. For all clays, acid activation, grinding, preparing as nano clays, and sonication were suggested as modification techniques.

**Keywords:** Natural clay, Model oil, Beta carotene, Chlorophyll, Adsorption

## GİRİŞ

Yemelik bitkisel yağlar renklerini bitki yapısında doğal olarak bulunan ve yağa geçen lipokromlar olarak gruplandırılan yağda çözünen pigmentlerden almaktadırlar. Lipokrom grubu içinde en yaygın olanlar karotenoitler ve klorofildir. Bunların dışında, pamuk yağında bulunan gossipol, bazı yağlarda bulunabilen antosiyaninler ve ayrıca yağda oluşan bazı kimyasal reaksiyonlar sonucu açığa çıkan koyu renkli bileşenler de renk oluşumuna katkıda bulunurlar. Ayrıca yağda bulunan veya bulaşan bakır, demir, mangan ve bu metallerin türevleri de renk değişimlerine neden olmaktadır [1].

Yemelik ham yağlardaki koyu ve istenmeyen renkler yağ rafinasyonunun bir işlemi olan 'ağartma veya dekolorizasyon' ile yağdan uzaklaştırılmaktadır. Ağartmanın esası renk veren pigmentlerin yağa katılan killere adsorbe edilmesi ve süzme ile yağdan uzaklaştırılmasıdır. Ağartma işlemi ile istenmeyen renk düzeltilirken, ayrıca yağda bulunan diğer bozunma ürünleri de (serbest yağ asitleri, sabunlar, oksidasyon ürünleri, vb.) kısmen uzaklaştırılmaktadır. Ağartma işlemi böylece yağın duyuşal özelliklerinin iyileşmesine ve daha dayanıklı hale gelmesine de yardımcı olmaktadır [1, 2].

Yemelik yağların ağartılması için uzun zamandan beri ağartma killeri kullanılmaktadır. Genellikle doğal olarak üretilen killer, belli tanecik boyutuna indirgenip, asitle yıkanarak organik kalıntıları uzaklaştırılmakta ve tek olarak veya birkaç kilin karışımı olarak kullanılmaktadırlar. Bunlardan doğal aktif ve belirli bir renk açma gücünde olan killer, Atapulgit, Montmorillonit, Baydellit, Nontronit, Hektorit ya da benzeri mineral yapısına sahip killer olarak tanımlanmaktadır [1, 3].

Daha etkili killeri bulmak veya teknolojik olarak oluşturmak için birçok çalışma yapılmaktadır. Özellikle yeni kil kaynaklarının denenmesi, bilinen killerin belli modifikasyonlara (nano boyuta indirgeme, yüzey kimyasal grupların değiştirilmesi, kombinasyonların bulunması, vb.) uğratıldıktan sonra denenmesi ilgiyle karşılanan araştırma konularıdır. Önen ve Gökay [4] tarafında yapılan bir çalışmada sepiyolit ayçiçeği yağının ağartılmasında kullanılmıştır. İki farklı ağartma sıcaklığının (90-100°C), dört farklı ağartma süresinin (15, 30, 45 ve 60 dakika) ve 7 farklı yağ/kil oranının (%0.5; 0.65; 0.8; 0.95; 1.1; 1.25 ve 1.4) denendiği çalışmada, Tonsil optimum 210 FF kili kontrol grubu olarak tercih edilmiştir. Deneysel çalışmalar, ham sepiyolit ve Tonsilin birbirine yakın ağartma verimi sağladığı, ancak sepiyolit ile adsorpsiyon hızının daha yavaş olduğunu göstermiştir. Gürpınar tarafından yapılan çalışmada, Trakya bölgesinden elde edilen doğal bentonitin ayçiçeği yağının ağartma prosesinde etkisi araştırılmıştır

[5]. Bu çalışmada ham bentonit killerin uygun asit aktivasyon koşullarını belirlemek amacıyla 2N, 4N ve 8N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl ve H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltileri kullanılarak 1 saat, 3 saat ve 5 saat sürelerinde aktivasyon işlemi yapılmıştır. Asitle aktivasyon işlemi en yüksek ağartma verimleri, 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile 5 saat, 4N HCl ile 3 saat ve 8N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ile 5 saat aktivasyon uygulanan killerde elde edilmiş ve ağartma verimleri sırasıyla %68.65, %62.41 ve %49.35 olarak bulunmuştur. Bir diğer çalışmada, aktifleştirilmiş bentonit kanola yağının ağartma işlemi kullanılmıştır. Ayrıca aktifleştirilen bentonit; alüminyum, demir, mangan ve kobalt ile 500°C'de kalsinasyon işlemine tabi tutularak tabakalandırılmıştır. Sonuçlar tabakalandırılmış bentonitin diğerinden daha etkili bir ağartma kili olduğunu göstermiştir [6].

Bu çalışmada bazıları daha önce hiç çalışılmamış dokuz farklı doğal kil ve iki adet ticari ağartma toprağı hazırlanan model bir yağdan beta karoten ve klorofilin uzaklaştırılması için kullanılmıştır. Çalışma hem bazı killeri bu amaçla ilk defa test ettiği hem de çalışmanın bir model yağ sisteminde yapılması nedeniyle yenilik içermektedir. Bu çalışmanın amacı model yağda çözüldürülen beta karoten ve klorofil pigmentlerinin adsorpsiyon etkinliğinin renk değişimlerinin ölçülmesiyle doğal killer ve ticari ağartma toprakları için karşılaştırılmasıdır.

## MATERYAL ve METOT

### Materyaller

Bu çalışmada kullanılan soğuk pres fındık yağı (Tito marka) piyasadan satın alınmıştır. Kullanılan yağın serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden %8.1±0.7 olarak ve peroksit sayısı da 11.1±0.8 meqO<sub>2</sub>/kg yağ olarak ölçülmüştür. Model yağı hazırlamak için kullanılan β-Karoten (%30'lük, Yağda çözünür, Tito marka) ve Klorofil (%3'lük, Yağda çözünür, Tito marka) piyasadan satın alınmıştır. Ticari ağartma toprağı-1 (T.A.T.-1) (Pure-Flo Supreme B-81 marka), Ata Endüstriyel Ürünler Ltd. (İstanbul) firması tarafından, ticari ağartma toprağı-2 (T.A.T.-2) (Amcol 930 marka), Trakya Birlik Yağ fabrikası (Çorlu, Tekirdağ) tarafından sağlanmıştır. Kullanılan doğal killer olan Halloysit (Esan A.Ş., Eskişehir), Zeolit (Türkzeolit Madencilik, Balıkesir), Bentonit (Rota Madencilik A.Ş., İstanbul), Sepiyolit (Madkim Maden ve Kimya Ltd. Şti., İstanbul), Diatom Toprağı (CMM Kimyevi Maddeler, Mineraller Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul), Magnesol XL (The Dallas Group of America, Inc., Jeffersonville, IN, ABD), Kaolin (Kaolin Endüstriyel Mineraller San. ve Tic. A.Ş., İstanbul), Montmorillonit (Rota Madencilik A.Ş., İstanbul), ve Perlit (Genper A.Ş., İstanbul) piyasadan temin edilmiştir. Tüm doğal killer 100 mikron elekten geçirilmiş ve elek altı kısım (parçacık boyutu 100 mikrondan küçük olan)

kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan killer Şekil 1'de gösterilmiştir. Analizler sırasında kullanılan tüm solventler, standartlar ve kimyasal maddeler Sigma Kimyasallar Şti. (St. Louis, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından satın alınmıştır.

### Model Yağın Hazırlanması

Satın alınan soğuk pres fındık yağı önce adi filtre kağıdından süzülerek içerisinde bulunması muhtemel olan tüm safsızlıklardan arındırılmıştır. Oldukça berrak ve nerdeyse renksiz olan bu yağ model yağları hazırlamak için kullanılmıştır. Soğuk pres fındık yağına, 100 g yağa 0.092 g klorofil veya 100 g yağa 0.035 g beta karoten olacak şekilde pigmentler katılmış, daha sonra yağ 50°C'de ısıtılarak 15 dakika karıştırılmış ve pigmentlerin tam olarak çözünmesi ve dağılması sağlanmıştır. Model yağa katılacak pigment miktarlarını belirlemek için ön denemeler yapılmış ve yemeklik yağlarda görülen renk tonlarına benzer rengi veren pigment konsantrasyonları seçilmiştir. Bunun için elimizde bulunan natürel zeytinyağının yeşil tonuna yakın değer sağlayan klorofil ve ham mısırozü yağının

sarı-turuncu tonuna yakın renk veren beta karoten katım oranı seçilmiştir. Model yağ her tekerrür çalışmasında 250 g olarak hazırlanmış ve bekletilmeden muamelelerde kullanılmıştır.

### Model Yağın Adsorban Killer İle Muamelesi

Model yağdan 10'ar g örnek 12 adet behere tartılmıştır. Her yağ örneğinin üzerine yağ ağırlığının %5'i kadar (0.5 g) kil eklenmiştir. Beheler ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde 80°C'de 0.5 saat karıştırılmıştır. Muamelelerden sonra yağ:adsorban karışımı Whatman no. 40 filtre kağıdından yer çekim ivmesi altında süzümüştür. Ticari ağartma topraklarıyla da aynı katım oranında ve aynı koşullarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Tüpler içerisine toplanan örneklerin analizleri hemen yapılmıştır. Analizler süresince tüpler buzdolabında tutulmuştur. Muamele edilen yağ örnekleri Şekil 2 ve 3'de gösterilmiştir. Kontrol örneği, adsorban kil katımı hariç diğer tüm işlemlere benzer şekilde tabi tutulmuş (ısıtma, karıştırma, süzme) ve onun da tüm analizleri yapılmıştır.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan ticari ağartma toprakları ve doğal killer (1-T.A.T.-1, 2-T.A.T.-2, 3-Halloysit, 4-Zeolit, 5-Bentonit, 6-Sepiyolit, 7-Diatom Toprağı, 8-Magnesol XL, 9-Kaolin, 10-Montmorillonit, 11-Perlit)

*Figure 1. The commercial bleaching earths and natural clays used in this study (1-C.B.E.-1, 2-C.B.E.-2, 3-Halloysite, 4-Zeolite, 5-Bentonite, 6-Sepiyolite, 7-Diatom Earth, 8-Magnesol XL, 9-Kaolin, 10-Montmorillonit, 11-Perlit)*

### Yağda Ağırlık Kaybı Ölçümü

Muameleler sonunda yağda oluşan toplam ağırlık kaybını bulmak için, filtrasyon sonrası tüpte toplanan yağ tekrar tartılmıştır. Başlangıçta tüm muameleler için 10 g yağ tartıldığı için son tartım ve ilk tartım değerleri kullanılarak, ağırlık kaybı yüzde değer olarak hesaplanmıştır.

### Yağda Aletsel Renk Ölçümü

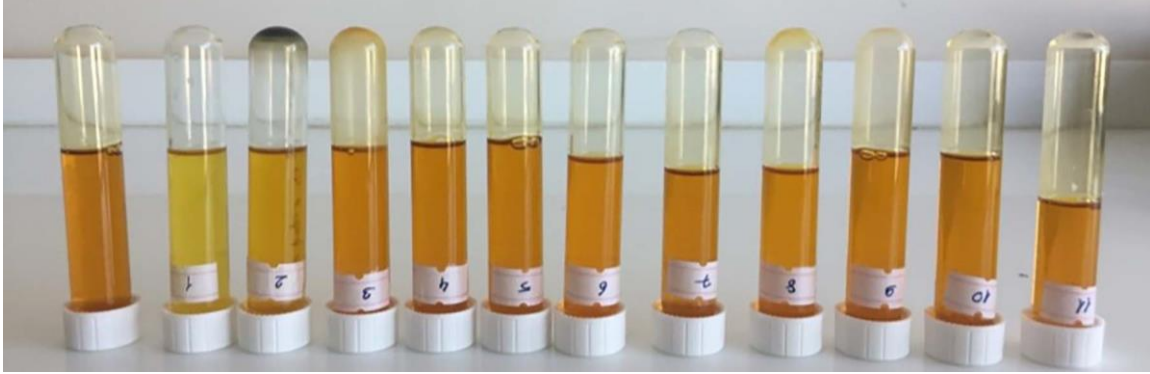
Kontrol ve muamele edilmiş yağ örneklerinin aletsel renk değerleri Minolta CR-400 Reflektans kolorimetresi (Japonya) ile belirlenmiştir. Cihaz önce kendi beyaz seramiğine karşı kalibre edilmiş ve ölçümler cihazın sıvı örnek kabı kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda, aletsel rengin

L, a\* ve b\* değerleri kaydedilmiştir. L değeri, parlaklığı ifade etmekte olup, tam koyuluk (L=0) ile tam berraklık (L=100) arasındaki değeri göstermektedir. Aletsel rengin a\* değeri, kırmızılık (+a\*) ile yeşillik (-a\*) miktarını ifade etmektedir. Benzer şekilde b\* değeri ise sarılık (+b\*) ile mavilik (-b\*) değerini göstermektedir. Ölçümler her yağ örneği için rastgele birçok noktada yapılmış olup, ortalama değerler rapor edilmiştir. Ayrıca kontrol örneğine göre toplam renk farkı ( $\Delta E$ ) değerleri de hesaplanmıştır. Toplam renk farkı her bir örneğin kontrol örneğinden

renk açısından bir farkının olup olmadığının bir ölçütüdür. Hesaplama kullanılan Denklem 1 aşağıda verilmiştir;

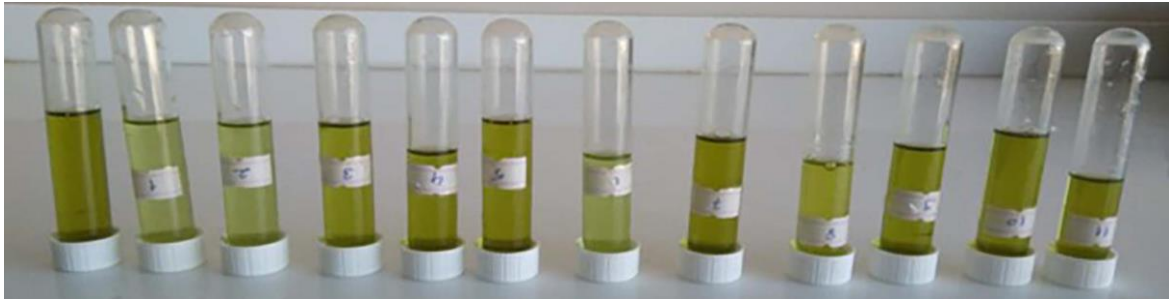
$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (\text{Denklem 1})$$

Eğer  $\Delta E=1$  ise renk farkı önemli,  
Eğer  $\Delta E>1$  ise renk farkı çok önemli,  
Eğer  $\Delta E<1$  ise renk farkı önemsiz olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 2. Beta karoten içeren kontrol ve muamele edilmiş yağ örnekleri (Kontrol, 1-T.A.T.-1, 2-T.A.T.-2, 3-Halloysit, 4-Zeolit, 5-Bentonit, 6-Sepiyolit, 7-Diatom Toprağı, 8-Magnesol XL, 9-Kaolin, 10-Montmorillonit, 11-Perlit)

*Figure 2. Control and treated oil samples containing beta carotene (Control, 1-C.B.E.-1, 2-C.B.E.-2, 3-Halloysite, 4-Zeolite, 5-Bentonite, 6-Sepiyolite, 7-Diatom Earth, 8-Magnesol XL, 9-Kaolin, 10-Montmorillonit, 11-Perlit)*



Şekil 3. Klorofil içeren kontrol ve muamele edilmiş yağ örnekleri (Kontrol, 1-T.A.T.-1, 2-T.A.T.-2, 3-Halloysit, 4-Zeolit, 5-Bentonit, 6-Sepiyolit, 7-Diatom Toprağı, 8-Magnesol XL, 9-Kaolin, 10-Montmorillonit, 11-Perlit)

*Figure 3. Control and treated oil samples containing chlorophyll (Control, 1-C.B.E.-1, 2-C.B.E.-2, 3-Halloysite, 4-Zeolite, 5-Bentonite, 6-Sepiyolite, 7-Diatom Earth, 8-Magnesol XL, 9-Kaolin, 10-Montmorillonit, 11-Perlit)*

### Yağda Serbest Yağ Asitliği ve Asit Sayısı Analizi

Kontrol ve muamele edilmiş yağ örneklerinin serbest yağ asitliği değerleri AOCS'nin Ca 5a-40 metodu takip edilerek, oleik asit cinsinden belirlenmiştir [7]. Benzer şekilde asit sayısı analizi de AOCS'nin Cd 3d-63 metoduna uygun olarak gerçekleştirilmiştir [7].

### Yağda Peroksit Sayısı Analizi

Yağ örneklerinin peroksit sayısı değerleri AOCS Cd 8-53 metodu esas alınarak belirlenmiştir [7].

### İstatistiksel Analizler

Bu çalışmadaki yağların killerle ağartma muamele işlemleri 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Her bir tekerrür için ölçümler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla ortalama değer olarak sunulan her bir veri 6 ölçümün ortalamasını ve standart hatasını ifade etmektedir. Örnekleri karşılaştırmak için tek-yönlü ANOVA ve Tukey testi kullanılmıştır. Analizlerdeki güvenlik seviyesi en az %95 olup, Minitab bilgisayar paket programıyla gerçekleştirilmiştir [8].

**BULGULAR ve TARTIŞMA****Beta Karoten Renginin Uzaklaştırılması**

Araştırma kapsamında 9 doğal kil ve 2 ticari ağartma toprağıyla muamele edilen ve aynı koşullarda hiçbir kille muamele edilmeyen (kontrol) beta karoten ile hazırlanmış model yağ örneklerinin (Şekil 2) aletsel renk değerleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Renk ölçümünde L değeri parlaklığın bir ölçütü olup 100 (tam parlak, berrak, beyaz) ile 0 (tam mat, koyu, siyah) değerleri arasında değişmektedir. Örnekler arasında küçük farklılıklar oluşmuştur. En yüksek L değeri (29.8) kaolin ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. Kaolinin berraklaştırmada daha etkili olduğu görülmüştür. En düşük L değeri (27.5) T.A.T.-2 ağartma toprağı ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. T.A.T.-2, halloysit ve bentonit ile muamele edilmiş yağlar dışında tüm muamelelerde kontrol örneğine göre bir miktar artış, yani renkte bir miktar berraklaşma sağlanmıştır. Bazı örneklerin artış göstermemesi ağartma işleminde etkili olan bazı olumsuz etmenlerin varlığını göstermiştir. Bazı örneklerde kontrol örneğinden daha düşük L değerlerinin gözlenmesi pigmentlerin oksidasyonu veya muameleden sonra yağda bir miktar bulanıklığın oluşması ile açıklanabilir. Ayrıca muameleden sonra

yapılan filtrelemenin de basit bir işlem olduğu ve endüstride uygulanan filtrelemeden farklı olduğu unutulmamalıdır. Ancak tüm muameleler eş koşullarda yapıldığı için killeri kıyaslamak mümkündür.

Tablo 1'de verilen a\* ve b\* değerleri renk ölçümünde sırasıyla kırmızı/yeşil ve sarı/mavi koordinat değerlerini göstermektedir. Değerlerde +a\* kırmızıyı, -a\* ise yeşili ve +b\* sarıyı, -b\* ise maviyi belirtmektedir [9, 10]. Muamele edilen killere yağdaki kırmızı renk pigmentinin azalması ve a\* değerinin kontrol değerinden daha düşük değere gelmesi amaçlanmıştır. Kontrol örneği a\* değeri (1.5) muamele edilen örneklerin değerleri ile kıyaslandığında, a\* değerinin en düşük olarak elde edildiği değer (-1.4) ile T.A.T.-1 ağartma toprağı ile muamele edilen örnek olduğu görülmüştür. Ticari ağartma toprakları hariç tutulduğunda ise, halloysit kilinin en düşük a\* değerini sağladığı, yani beta karoteni en etkili şekilde adsorbe ettiği görülmektedir. Tabloda en düşük ölçülen b\* değeri (4.5) halloysit ile muamele edilen örnekte ölçülmüştür. Yani halloysit kili sarı renkli pigmentleri de daha etkili bir şekilde uzaklaştırmıştır. En yüksek değer (8.3) ise T.A.T.-1 ağartma toprağında ölçülmüştür. Bu kilin sarı renk veren pigmentlerin uzaklaştırılmasında yeterince etkili olmadığı anlaşılmıştır.

Tablo 1. Ticari ağartma toprakları ve doğal killer ile muamele edilmiş beta karoten ile hazırlanmış model yağ örneklerinin renk değerleri

*Table 1. Color values of model oils prepared with beta carotene and treated with commercial bleaching earths and natural clays*

Örnek	L Değeri <sup>1</sup>	a* Değeri	b* Değeri	Toplam Renk Farkı (ΔE)
Kontrol	28.9±0.5 <sup>a</sup>	1.5±0.2 <sup>c</sup>	6.3±0.0 <sup>d</sup>	-
T.A.T.-1	29.5±0.3 <sup>a</sup>	-1.4±0.0 <sup>g</sup>	8.3±0.2 <sup>a</sup>	2.1 <sup>b</sup>
T.A.T.-2	27.5±0.5 <sup>c</sup>	-0.03±0.0 <sup>f</sup>	6.7±0.1 <sup>d</sup>	2.3 <sup>a</sup>
Halloysit	28.6±0.4 <sup>b</sup>	0.7±0.2 <sup>e</sup>	4.5±0.1 <sup>e</sup>	1.8 <sup>b</sup>
Zeolit	29.2±0.5 <sup>a</sup>	1.6±0.2 <sup>c</sup>	6.4±0.0 <sup>d</sup>	0.3 <sup>g</sup>
Bentonit	28.9±0.2 <sup>a</sup>	1.6±0.1 <sup>c</sup>	6.6±0.0 <sup>d</sup>	0.4 <sup>f</sup>
Sepiyolit	29.1±0.4 <sup>a</sup>	1.8±0.0 <sup>b</sup>	7.6±0.1 <sup>b</sup>	1.6 <sup>c</sup>
Diatom Toprağı	29.2±0.4 <sup>a</sup>	1.4±0.1 <sup>c</sup>	6.9±0.2 <sup>c</sup>	0.7 <sup>e</sup>
Magnesol XL	29.3±0.5 <sup>a</sup>	2.6±0.2 <sup>a</sup>	7.5±0.0 <sup>b</sup>	1.6 <sup>c</sup>
Kaolin	29.8±0.5 <sup>a</sup>	1.5±0.0 <sup>c</sup>	6.7±0.0 <sup>d</sup>	0.9 <sup>d</sup>
Montmorillonit	29.5±0.2 <sup>a</sup>	1.5±0.1 <sup>c</sup>	6.5±0.1 <sup>d</sup>	0.6 <sup>e</sup>
Perlit	29.6±0.3 <sup>a</sup>	1.1±0.0 <sup>d</sup>	7.1±0.0 <sup>c</sup>	1.1 <sup>d</sup>

<sup>1</sup>Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen örnekler istatistik olarak birbirlerinde farklıdır (p<0.05)

<sup>1</sup>Samples with different superscripts in the same column indicate statistically significant differences (p<0.05)

Toplam renk farkı (ΔE) renk metodunun boyutunu gösteren sayısal bir değerdir. İki maddenin rengini kıyaslamak için kullanılır. Tablo 1'de verilen toplam renk farkı değerleri kontrol örneği ile ağartma toprağı ve killere muamele edilen örnekler arasındaki karşılaşmayı vermektedir. Ölçülen en düşük toplam renk farkı değeri (0.3) zeolit ile muamele edilen örnektir. En yüksek değer (2.3) T.A.T.-2 ağartma toprağı ile muamele edilen örnekte ölçülmüştür. T.A.T.-2 ağartma toprağının renk açma işleminde daha etkili olduğu anlaşılmaktadır. Doğal killere ise halloysitin ve sepiyolit diğerlerinden daha etkili olduğu görülmektedir.

Genel olarak, model yağdan beta karoten pigmentinin uzaklaştırılmasında ticari ağartma topraklarının (T.A.T.-1

ve T.A.T.-2) diğer doğal killere göre daha etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Doğal killer arasında ise halloysitin belli bir kapasiteye sahip olduğu ve bazı modifikasyonlarla (ince öğütme, asitle yıkama vb.) kapasitesinin geliştirilebileceği değerlendirilmiştir.

Kontrol ve muamele edilmiş yağ örneklerindeki ağırlık kaybı ve bazı önemli fiziko-kimyasal özellikleri ölçülmüş ve Tablo 2'de verilmiştir. Örneklerdeki ağırlık kaybı, ne kadar yağın kile tutularak veya bağlanarak ana kitleden uzaklaştırıldığına bir ölçütüdür. Genel olarak ağırlık kaybının kullanılabilecek kilin toplam por alanı, yüzey alanı ve nötral yağa karşı bağlama affinitesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir [9]. Kontrol örneği kille muamele edilmesi dışında aynı işlemlere (ısıtma ve filtre



kâğıdından süzme) tabi tutulmuştur. Dolayısıyla kontrol örneğinde hesaplanan ağırlık kaybı aslında sadece filtre kâğıdı tarafından tutulan yağ miktarını belirlemektedir. Muamele edilen örneklerdeki rakam ise ayrıca 0 kil tarafından bağlanan yağ miktarını göstermektedir. Endüstriyel uygulamalarda yağ kaybının en az olması istenmektedir. Bunun için adsorban kil katım oranı mümkün olduğunca düşürülmekte ve etkili süzme işlemi yapılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmada tüm örnekler standart ve aynı muamele uygulandığı için oluşan yağ kaybı kullanılan kil farklılığından kaynaklanmaktadır. Tablo 2'den de görüleceği gibi en fazla ağırlık kaybı perlit (%45.3) ile muamele edilen örnekte, en az ağırlık kaybı ise bentonit (%22.1) ile muamele edilen örnekte ölçülmüştür. Kontrol örneğinde sadece filtrenin %22'lik yağ kaybına neden olduğu anlaşılmaktadır.

Yağ kaybının minimum düzeyde tutulmasını sağladığı için bentonit ağartma işleminde kullanılabilir verimli bir kildir. Perlit işlem maliyeti ve kazancı için verimli olmayacaktır. Bentonit, zeolit ve halloysit ticari ağartma topraklarından daha düşük yağ kaybı verdiği için ümit verici olarak değerlendirilmişlerdir. Ağartma muamele işlemi yapılırken belli sıcaklık (80°C), süre (0.5 saat) ve basınç (atmosfer basıncı) kullanılmış olup, filtreleme işlemi de doğal yer çekimi ivmesi altında 6-8 saat kadar

sürmüştür. Bu koşulların yağda bazı istenmeyen hidrolitik ve oksidatif reaksiyonları katalizleyebileceği değerlendirildiği için, örneklerde serbest yağ asitliği ve asit sayısı ile peroksit sayısı değerleri de ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir. Serbest yağ asitliği ve asit sayısı, yemeklik yağların tüketici kabulü için oldukça önemlidir. Asitliği belli değerlerin üstüne çıkan yağın tadı ekşi olacağı için tüketilmesi zorlaşmaktadır [1, 2]. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı İle Anılan Yağlar Tebliğine [11] göre fındık yağının yağ asitleri kompozisyonunda oleik asit baskın konumdadır ve toplam yağ asidi yüzdesinin %74.2-86.7'sini oluşturmaktadır. Tebliğe göre asit sayısı rafine yağlarda en çok 0.6 mg KOH/g yağ, soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok 4.0 mg KOH/g yağ olarak belirlenmiştir. Tablo 2'deki değerlere bakıldığında ağartma muamelesi uygulanan ham fındık yağının kontrol örneğinin asit sayısı değerlerinin bile tebliğde belirtilen değerlerden yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum dikkate alınarak nisbi azalma ve artış değerleri belirlenmiştir. Kontrol örneğinin asit sayısı değerine (17 mg KOH/g yağ) bakılarak en düşük asit sayısı değeri (15.3 mg KOH/g yağ) Magnesol XL ile muamele edilen örnekte ölçülmüştür. Perlit, sepiyolit ve zeolit killeri de diğerlerinden biraz daha düşük asit sayısı değerleri vermişlerdir.

Tablo 2. Ticari ağartma toprakları ve doğal killer ile muamele edilmiş beta karoten ile hazırlanmış model yağ örneklerinin ağırlık kaybı ve bazı kimyasal ölçüm değerleri

*Table 2. Weight loss and some chemical properties of model oils prepared with beta carotene and treated with commercial bleaching earths and natural clays*

Örnek	Ağırlık Kaybı <sup>1</sup> (%)	Serbest Yağ Asitliği (% oleik)	Asit Sayısı (mg KOH/g yağ)	Peroksit Sayısı (meqO <sub>2</sub> /kg yağ)
Kontrol	22.0±0.5 <sup>g</sup>	8.4±0.1 <sup>b</sup>	17.0±0.1 <sup>a</sup>	21.8±0.8 <sup>d</sup>
T.A.T.-1	26.7±0.2 <sup>e</sup>	8.0±0.0 <sup>f</sup>	16.0±0.2 <sup>b</sup>	0.0±0.0 <sup>i</sup>
T.A.T.-2	26.0±0.3 <sup>e</sup>	8.6±0.0 <sup>a</sup>	17.2±0.0 <sup>a</sup>	3.3±0.1 <sup>g</sup>
Halloysit	25.4±0.2 <sup>f</sup>	8.4±0.2 <sup>b</sup>	16.8±0.1 <sup>b</sup>	2.7±1.0 <sup>g</sup>
Zeolit	23.6±0.2 <sup>f</sup>	8.1±0.0 <sup>e</sup>	16.2±0.0 <sup>b</sup>	11.2±0.3 <sup>f</sup>
Bentonit	22.1±0.0 <sup>g</sup>	8.6±0.1 <sup>a</sup>	17.3±0.0 <sup>a</sup>	0.6±0.3 <sup>i</sup>
Sepiyolit	28.3±0.0 <sup>d</sup>	8.1±0.2 <sup>e</sup>	16.2±0.2 <sup>b</sup>	0.0±0.0 <sup>i</sup>
Diatom Toprağı	33.7±0.5 <sup>b</sup>	8.6±0.0 <sup>a</sup>	17.2±0.2 <sup>a</sup>	17.1±0.2 <sup>e</sup>
Magnesol XL	30.9±0.0 <sup>c</sup>	7.7±0.3 <sup>g</sup>	15.3±0.3 <sup>c</sup>	23.1±0.3 <sup>c</sup>
Kaolin	26.8±0.2 <sup>e</sup>	8.3±0.0 <sup>c</sup>	16.7±0.1 <sup>a</sup>	79.1±1.3 <sup>a</sup>
Montmorillonit	26.0±0.0 <sup>e</sup>	8.2±0.0 <sup>d</sup>	16.4±0.2 <sup>b</sup>	33.0±0.1 <sup>b</sup>
Perlit	45.3±0.0 <sup>a</sup>	8.0±0.1 <sup>f</sup>	16.0±0.3 <sup>b</sup>	1.3±0.1 <sup>h</sup>

<sup>1</sup>Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen örnekler istatistik olarak birbirlerinde farklıdır ( $p<0.05$ )

<sup>1</sup>Samples with different superscripts in the same column indicate statistically significant differences ( $p<0.05$ )

Serbest yağ asitliği değerleri incelendiğinde (Tablo 2), en düşük değeri (%7.7) Magnesol XL ile muamele edilmiş örnekte olduğu görülmüştür. Bundan sonraki düşük değerler sırasıyla T.A.T.-1, perlit, zeolit ve sepiyolit ile muamele edilmiş örneklerde ölçülmüştür. Şüphesiz yağın ağartılması esnasında serbest yağ asitlerinin de uzaklaştırılması bir avantaj sağlamaktadır. Ancak bu durumun toplam ağırlık kaybıyla birlikte değerlendirilmesinde fayda vardır.

Yemeklik yağlarda oksidasyonun en geçerli ölçütlerinden birisi peroksit sayısıdır. Kontrol ve muamele edilmiş örneklerin peroksit sayısı değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 2'de sunulmuştur. Peroksitler yağların birincil oksidasyonu sonucu oluşan bileşiklerdir. Yağların bozulmuşluğu ile doğru orantılı bir

ilişkisi vardır [1, 2, 9]. Yağların peroksit içerikleri Türk Gıda Kodeksinde belli değerler ile sınırlandırılmıştır. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı İle Anılan Yağlar Tebliği'nde rafine yağlarda en çok 10 meqO<sub>2</sub>/kg yağ, soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok 15 meqO<sub>2</sub>/kg yağ olarak peroksit sayısı değerleri belirlenmiştir [11]. Kontrol örneğinde ölçülen peroksit değeri (21.8 meqO<sub>2</sub>/kg) standardın üzerindedir. Bu durumun yüksek ısıda karıştırma ve uzun süren filtreleme işlemi sırasında yağ örneklerinin havaya maruz kalmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Laboratuvar ortamında uygulanamamış olmakla birlikte, endüstriyel ağartma işlemleri tam vakum altında ve hermetik ortamda hava teması olmadan yapılmakta ve oksidasyonun önüne geçilmektedir. Bu çalışmada karşılaştırma amaçlı eş koşullar altında ağartma kapasitesi araştırılmıştır.

T.A.T.-1 toprağı ve sepiyolit ile muamele edilen örneklerde peroksit saptanmamıştır. Bu killerin oluşan peroksitlerin tamamını adsorbe ettiği veya oluşan peroksitlerin parçalandığı anlaşılmaktadır. Bu durum avantajlı bir sonuç olarak değerlendirilebilir, ancak oksidasyonun ikincil ürünleri ölçülmediği için, peroksit ve parçalanma ürünlerinin adsorpsiyonla ne kadarının uzaklaştırıldığı bilinmemektedir. Bentonit ile muamele edilen örnekteki değer (0.6 meqO<sub>2</sub>/kg yağ) de düşük olup, bu kilin de peroksit bağlamada etkili olduğu görülmüştür. Ölçülen en yüksek değer (79.1 meqO<sub>2</sub>/kg yağ) kaolin ile muamele edilen örnekte görülmüştür. Bu kilin yağ oksidasyonunu katalizleyen iz metal kalıntısı içermesi olasılığı düşünülmüştür. Peroksit değerlerindeki azalma adsorban killerin yağdaki peroksitleri adsorplayıp yağdan uzaklaştırması ile açıklanmıştır. Ancak oluşan birincil oksitlerin kendiliğinden parçalanma ihtimali de bulunmaktadır. Serbest yağ asitliği ve peroksit sayısı ölçümleri birlikte değerlendirildiğinde, ticari ağartma topraklarıyla kıyaslama yapılırsa, halloysit, sepiyolit ve bentonitin umut verici olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca bu çalışmada killer doğal formlarıyla araştırılmış olup, asitle yıkama, yakma, kalsinasyon vb. modifikasyon işlemleri yapılmamıştır. Killerin doğal formlarında birbirleriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bir çalışmada [12], okzalik ve sülfirik asitle modifiye edilmiş kaolin kilinin pirinç kepeği yağını

ağartmada doğal formuna göre daha etkili olduğu ve dekolizasyon kapasitesinin yaklaşık %80-90 arttığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda kaolin modifiye edilmemiştir, ancak belli seviyede dekolizasyon etkenliğinin olduğu ve yağda oksidasyonu artırdığı belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada [13] asitle aktifleştirilmiş sepiyolit beta-karoten adsorplama mekanizması çalışılmıştır. Çalışma sonunda, beta-karotenin, sepiyolit kilinin dışındaki mezo-yüzeyle ve kristaller-arası kanal ve tünellere geçerek adsorbe olduğu ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda da sepiyolit beta-karoten rengini uzaklaştırmada etkili olduğu ve daha da önemlisi peroksitleri de oldukça etkili bir şekilde adsorbe ettiği ortaya konulmuştur.

### Klorofil Renginin Uzaklaştırılması

Klorofil pigmenti ile hazırlanmış model yağda da aynı işlemler yapılmış ve sonuçlar Tablo 3 ve Tablo 4'de sunulmuştur. Genel olarak beta karoten ve klorofilin kimyasal yapıları birbirlerinden farklı lipokromlar olduğu bilindiği için, bunların killer tarafından farklı şekillerde adsorplanacağı hipotez edilmiştir. Her iki lipokrom da farklı bitkisel ham yağlarda bulunabilmektedir. Dolayısıyla araştırmaya konu olmaları olağan bir beklentidir.

Tablo 3. Ticari ağartma toprakları ve doğal killer ile muamele edilmiş klorofil ile hazırlanmış model yağ örneklerinin renk değerleri

*Table 3. Color values of model oils prepared with chlorophyll and treated with commercial bleaching earths and natural clays*

Örnek	L Değeri <sup>1</sup>	a* Değeri	b* Değeri	Toplam Renk Farkı (ΔE)
Kontrol	27.5±0.0 <sup>e</sup>	-1.9±0.0 <sup>e</sup>	5.0±0.1 <sup>g</sup>	-
T.A.T.-1	29.9±0.0 <sup>b</sup>	-1.5±0.1 <sup>g</sup>	3.3±0.0 <sup>i</sup>	2.9 <sup>c</sup>
T.A.T.-2	29.2±0.0 <sup>c</sup>	-1.8±0.0 <sup>f</sup>	4.0±0.1 <sup>h</sup>	1.9 <sup>f</sup>
Halloysit	29.3±0.1 <sup>c</sup>	-2.2±0.0 <sup>c</sup>	5.2±0.0 <sup>f</sup>	1.8 <sup>g</sup>
Zeolit	29.9±0.0 <sup>b</sup>	-2.3±0.1 <sup>b</sup>	5.6±0.1 <sup>c</sup>	2.5 <sup>d</sup>
Bentonit	29.1±0.1 <sup>c</sup>	-2.2±0.0 <sup>c</sup>	5.5±0.1 <sup>d</sup>	1.6 <sup>h</sup>
Sepiyolit	32.6±0.0 <sup>a</sup>	-1.5±0.0 <sup>g</sup>	1.4±0.0 <sup>j</sup>	6.2 <sup>a</sup>
Diatom Toprağı	29.5±0.0 <sup>b</sup>	-2.3±0.1 <sup>b</sup>	5.7±0.0 <sup>b</sup>	2.1 <sup>e</sup>
Magnesol XL	29.4±0.0 <sup>bc</sup>	-2.0±0.0 <sup>d</sup>	2.4±0.0 <sup>i</sup>	3.1 <sup>b</sup>
Kaolin	29.2±0.0 <sup>c</sup>	-2.4±0.1 <sup>a</sup>	5.8±0.1 <sup>a</sup>	1.9 <sup>f</sup>
Montmorillonit	28.5±0.1 <sup>d</sup>	-2.3±0.1 <sup>b</sup>	5.7±0.0 <sup>b</sup>	1.2 <sup>i</sup>
Perlit	29.5±0.1 <sup>b</sup>	-2.2±0.0 <sup>c</sup>	5.4±0.1 <sup>e</sup>	2.1 <sup>e</sup>

<sup>1</sup>Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen örnekler istatistik olarak birbirlerinde farklıdır (p<0.05)

<sup>1</sup>Samples with different superscripts in the same column indicate statistically significant differences (p<0.05)

Tüm örneklerde, kontrolle karşılaştırıldığında toplamda bir renk farkının meydana geldiği görülmektedir (ΔE > 1). Oluşan toplam renk farkının sepiyolit ile muamelede en fazla (6.2) ve montmorillonit ile muamelede ise en az (1.2) olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 3). En yüksek L değeri (32.6) sepiyolit ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. Sepiyolit kilinin klorofil pigmentinin rengini açmada oldukça etkili olduğu görülmüştür. En düşük L değeri ise (28.5) montmorillonit ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. Tüm muamelelerde L değerinde kontrol örneğine göre bir miktar artış, yani renkte bir miktar berraklaşma sağlanmıştır (Tablo 3).

Örneklerin a\* değerleri Tablo 3'te verilmiştir. Renk ölçüm sisteminde +a\* değeri kırmızı renk miktarı olup, -a\* ise

yeşil renk miktarını ifade etmektedir. Örnekler arasında istatistik farklılıklar meydana gelmiş olup en yüksek -a\* değeri (-2.4) kaolin ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. Bu örnekte kontrole göre yeşillik değeri yükselmiştir. Bunun nedeni diğer pigmentlerin kaolin tarafından adsorplanması ve klorofilin ise adsorplanamaması olabilir. Böylece nisbi bir artış gerçekleşmiş olabilir. Kontrolle kıyaslandığında T.A.T.-1 ve sepiyolit yeşilliği düşürdüğü anlaşılmaktadır. Sepiyolit model yağda bulunan yeşil rengin açılmasında ve -a\* değerinin azalmasında daha etkili olduğu görülmüştür. Çoğunlukla tüm muamelelerde kontrol örneğine göre -a\* değerinde artış sağlanıp yeşil renk korunurken birkaç örnekte -a\* değerinde azalma olup renk açılması görülmüştür. Genel olarak kullanılan

killerin önemli çoğunluğunun klorofil bağlamada çok etkili olmadıkları anlaşılmaktadır.

Benzer şekilde örneklerde ölçülen  $b^*$  değerleri de tabloda verilmiştir. Renk ölçüm sistemindeki  $+b^*$  sarı renk miktarını,  $-b^*$  ise mavi renk miktarını ifade etmektedir. Kontrolle karşılaştırıldığında bazı örneklerin  $b^*$  değerleri azalırken yani sarı renkli pigmentler azalırken, bazılarında ise artış oluşmuştur. Artışın aslında klorofilin bağlanışına bağlı nisbi bir olgu olduğu anlaşılmaktadır. En yüksek  $b^*$  değeri (5.8) kaolin ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. En düşük  $b^*$  değeri ise (1.4) sepiyolit ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. Bu deneme grubunda model yağ klorofil ile hazırlandığı için, rengin yeşil dışındaki tonlarında meydana gelen değişimler killerin diğer pigmentleri bağlamasının bir sonucudur [5, 9]. Genel olarak yeşil rengi azaltmada sepiyolit kilinin ticari ağartma toprakları kadar etkili olduğu anlaşılmıştır. Bir araştırmada, asitle aktifleştirilmiş sepiyolit, kolza yağından klorofil-a uzaklaştırmadaki etkenliği test edilmiştir. Çalışma sonunda klorofil-a'nın hem kilin dış yüzeyine adsorbe olduğu hem de oktahedral tabakalarda  $Mg^{+2}$  iyonunun yerine geçerek iç kanallara ve tüplere yapıştığı belirlenmiştir [14]. Bizim çalışmamızda da klorofil uzaklaştırmada ve yeşil rengi açmada en başarılı kilin sepiyolit olduğu doğrulanmıştır.

Kontrol ve muamele edilmiş yağ örneklerindeki ağırlık kaybı değerleri hesaplanmış ve Tablo 4'de sunulmuştur. Yağ kaybı hem muamele esnasında killere yapışmadan hem de süzme işlemi sırasında filtre kâğıdında tutulmadan kaynaklanmaktadır. Endüstriyel uygulamalarda da yağ kaybının en az olması istenmektedir. Bunun için adsorban kil katım oranı mümkün olduğunca düşürülmekte ve etkili süzme işlemi yapılmaya çalışılmaktadır. Bu çalışmada tüm örnekler standart ve aynı muamele uygulandığı için oluşan yağ kaybı kullanılan kil farklılığından kaynaklanmaktadır. Yapılan ölçümler sonucunda kontrol örneğinin ağırlık kaybı %26.6 olarak belirlenmiştir. Kontrol örneğinde gözlenen bu kaybın filtre kâğıdından kaynaklandığı açıktır, çünkü bu örnekte zaten bir adsorban muamelesi bulunmamaktadır. Diğer örnekler incelendiğinde kontrol örneğine göre en fazla ağırlık kaybı perlit (%52.9) ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. Kontrol örneğine göre en az ağırlık kaybı bentonit (%23.5) ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüştür. Hatta bentonit ile muamele edilen örnekte kontrol örneğinden de daha az ağırlık kaybı gözlenmiştir. Bu durum ise oldukça ilginç bir sonuçtur. Bu muamele sonrasında yağın hiç adsorbe olmadığı veya filtreden daha etkili süzülmesi anlamına gelmektedir. Bir miktar pigmentin adsorbe olduğu bilindiğine göre, bu muamele yağın filtre kâğıdına tutunmasını azaltan bir etki göstermiştir. Bu durumun mekanizması bilinmemesine rağmen, sonuç yağ verimi açısından oldukça olumludur. Verilere bakıldığında perlit ile muamele edilen örnekte bu kadar fazla ağırlık kaybı olmasının nedeni perlitin yağı oldukça fazla tutmasından kaynaklanmaktadır. Bentonitin yağ tutma özelliği daha az olduğundan süzme işleminde yağ bentonitten kolayca ayrılarak ağırlık kaybını en aza indirmiştir. Killerin yağı tutma dereceleri farklı olduğundan ağırlık kayıplarında da gözle görülür (Şekil 2) farklılıklar meydana gelmiştir.

Kontrol ve muamele edilen yağ örneklerinin en önemli kalite kriterlerinden olan serbest yağ asitliği ve asit sayısı değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4'de verilmiştir. Serbest asitlik ve asit sayısı, yemeklik yağlarda tüketici kabulü açısından oldukça önemlidir. Asitliği belli değerlerin üstüne çıkan yağın duyu tat beğeni değeri azalmaktadır [1, 2]. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı İle Anılan Yağlar Tebliğine [11] göre soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda serbest yağ asitliği en fazla %0.6 olarak belirlenmiştir. Asit sayısı ise en çok 4.0 mgKOH/g yağ olarak verilmiştir. Yapılan analizlerde kontrol örneğinin serbest yağ asitliği  $8.3 \pm 0.3$  oleik asit olarak ölçülmüştür. Kontrol örneğinin asit sayısı ise  $16.6 \pm 0.1$  mgKOH/g yağ olarak ölçülmüştür. Kontrol örneği de dâhil olmak üzere muamele edilen tüm yağ örneklerinde kodekse uygunluk derecesine rastlanmamıştır. Buna sebep olarak model yağ yapılan muamele koşullarının olduğu düşünülmüştür. Özellikle yüksek ısıda karıştırma ve süzme işleminin uzun sürmesi bu analitik değerlerin yükselmesine neden olmuştur. Farklı killerle muamele edilen yağ örnekleri kontrol örneği ile karşılaştırıldığında serbest yağ asitliği ve asit sayısında en iyi azalma sonucunu Magnesol XL ile muamele edilen örnek vermiş ve serbest yağ asitliği (% oleik asit) 5.9 iken asit sayısı 11.9 mgKOH/g yağ olarak ölçülmüştür. Kontrol örneğine göre en fazla artış ise diatom toprağı ile muamele edilmiş örnekte serbest yağ asitliği (% oleik asit) 10.1 ve asit sayısı 20.2 mgKOH/g yağ olarak ölçülmüştür. Bu kilde yağ hidrolizini artıran bir bileşenin bulunabileceği değerlendirilmesi yapılmıştır. Magnesol XL'in çok iyi bir serbest yağ asidi giderici adsorban olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca halloysit de bu konuda belli bir potansiyel taşımaktadır ve ileride daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Yemeklik yağlarda oksidasyonun en geçerli ölçütlerinden birisi peroksit sayısıdır. Kontrol ve muamele edilmiş örneklerin peroksit sayısı değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4'te sunulmuştur. Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı İle Anılan Yağlar Tebliğine [11] göre soğuk preslenmiş ve natürel yağlarda en çok 15 meqO<sub>2</sub>/kg yağ olarak peroksit sayısına izin verilmiştir. Yapılan analiz sonucunda kontrol örneğinin peroksit sayısı 11.1 meqO<sub>2</sub>/kg yağ olarak ölçülmüştür. Kontrol örneği ile kıyaslandığında peroksit sayısında en fazla artış zeolit ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüş ve peroksit sayısı 24.3 meqO<sub>2</sub>/kg yağ olarak belirlenmiştir. Kontrol örneğine göre peroksit sayısında en fazla azalma sonucu ise T.A.T.-2 ile muamele edilmiş örnekte ölçülmüş ve peroksit sayısı 0.0 olarak belirlenmiştir. T.A.T.-2 kilinin çok etkili bir peroksit adsorplayıcısı olduğu anlaşılmaktadır. Peroksit sayısı oksidasyon derecesini gösteren önemli bir parametredir. Zeolitin yağdaki peroksitleri adsorplayıp yağdan uzaklaştırma etkisinin az olduğu analiz sonucu ile belirlenmiştir. Ayrıca, yağ katılan klorofilin pro-oksidan özellik gösterebileceği ve zeolitin bununla birlikte oksidasyonu katalizleyebileceği düşünülmüştür [1, 2, 9]. T.A.T.-2 ise yağda bulunan peroksitleri uzaklaştırdığı için peroksit değerinde ciddi bir azalma görülmüştür. Kodeksle karşılaştırıldığında ise perlit ve zeolit ile muamele edilen örnekler belirlenen değere uymazken diğer muamele edilen örnekler kontrol örneğinin de peroksit sayısında

azalma sağlayıp kodekse uygunluk göstermektedirler. Ayrıca yağdan oksidasyon ürünlerini uzaklaştırmada

halloysitin de oldukça etkili olduğu görülmüştür.

Tablo 4. Ticari ağartma toprakları ve doğal killeri ile muamele edilmiş klorofil ile hazırlanmış model yağ örneklerinin ağırlık kaybı ve bazı kimyasal ölçüm değerleri

*Table 4. Weight loss and some chemical properties of model oils prepared with chlorophyll and treated with commercial bleaching earths and natural clays*

Örnek	Ağırlık Kaybı <sup>1</sup> (%)	Serbest Yağ Asitliği (% oleik)	Asit Sayısı (mg KOH/g yağ)	Peroksit Sayısı (meqO <sub>2</sub> /kg yağ)
Kontrol	26.6±0.5 <sup>h</sup>	8.3±0.3 <sup>d</sup>	16.6±0.1 <sup>bc</sup>	11.1±0.5 <sup>c</sup>
T.A.T.-1	30.1±0.1 <sup>f</sup>	8.8±0.1 <sup>b</sup>	17.7±0.2 <sup>b</sup>	4.0±0.1 <sup>h</sup>
T.A.T.-2	32.0±0.2 <sup>e</sup>	8.3±0.2 <sup>c</sup>	16.7±0.0 <sup>bc</sup>	0.0±0.0 <sup>i</sup>
Halloysit	28.7±0.0 <sup>g</sup>	7.6±0.1 <sup>e</sup>	16.1±0.0 <sup>c</sup>	2.7±0.0 <sup>i</sup>
Zeolit	43.9±0.1 <sup>c</sup>	8.1±0.0 <sup>d</sup>	16.2±0.1 <sup>c</sup>	24.3±0.1 <sup>a</sup>
Bentonit	23.5±0.1 <sup>i</sup>	8.0±0.2 <sup>d</sup>	16.1±0.5 <sup>c</sup>	5.3±0.0 <sup>g</sup>
Sepiyolit	45.8±0.3 <sup>b</sup>	8.0±0.2 <sup>d</sup>	16.1±0.2 <sup>c</sup>	6.0±0.1 <sup>e</sup>
Diatom Toprağı	33.8±0.5 <sup>e</sup>	10.1±0.5 <sup>a</sup>	20.2±0.5 <sup>a</sup>	5.1±0.2 <sup>g</sup>
Magnesol XL	46.6±0.0 <sup>b</sup>	5.9±0.1 <sup>f</sup>	11.9±0.0 <sup>e</sup>	4.0±0.0 <sup>h</sup>
Kaolin	38.4±0.0 <sup>d</sup>	8.5±0.0 <sup>c</sup>	17.1±0.0 <sup>b</sup>	9.1±0.1 <sup>d</sup>
Montmorillonit	29.3±0.1 <sup>f</sup>	8.4±0.2 <sup>c</sup>	16.8±0.1 <sup>b</sup>	5.8±0.0 <sup>f</sup>
Perlit	52.9±0.2 <sup>a</sup>	7.7±0.1 <sup>e</sup>	15.5±0.1 <sup>d</sup>	15.8±0.2 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen örnekler istatistik olarak birbirlerinde farklıdır ( $p<0.05$ )

<sup>1</sup>Samples with different superscripts in the same column indicate statistically significant differences ( $p<0.05$ )

## SONUÇ

Bu çalışmada soğuk preslenmiş ve filtrelenmiş fındık yağına belli miktarlarda beta karoten ve klorofil katılarak model yağlar hazırlanmış ve hazırlanan bu yağlara iki ticari ağartma toprağı ve dokuz adet doğal kil ile ağartma işlemi uygulanmıştır. Muamele edilen örneklerde aletsel renk, toplam ağırlık kaybı, serbest yağ asitliği ve asit sayısı ile peroksit sayısı ölçülmüştür. Genel olarak model yağın renginin açılmasında ticari ağartma topraklarının başarılı olduğu görülmüştür. Ancak toplam yağ kaybı, serbest asitlik ve peroksit sayısı değerleri de dikkate alındığında, doğal killere bentonit, halloysit ve sepiyolit de belli kapasitelere sahip olduğu görülmüştür. Özellikle daha önce bu amaçla pek çalışılmamış olan halloysit kilinin önemli bir alternatif olma potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir. Ülkemizde de üretilen bu kilin asitle yıkama, ince öğütme, nano öğütme işlemlerinden sonra bu veya benzer amaçlar için araştırılması önerilmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] Kayahan, M. (2005). Yemeklik Yağ Rafinasyon Teknolojisi. Gıda Mühendisleri Odası Yayınları, Ankara.
- [2] Nas, S., Gökalp, H.Y. (2017). Bitkisel Yağ Teknolojisi. Sidas Medya Ltd. Şti., İzmir.
- [3] Serin, S., Öner Z. (2011). Yağ sanayiinde kullanılan aktif toprağın yeniden kullanılabilir özelliğe getirilmesi. <https://ikmib.org.tr/tr/faaliyetlerimiz-ar-ge-proje-pazari-temel-kimyasallar-ve-diger-sektor-projeleri-2011-yili-projeleri-yag-sanayiinde-kullanilan-aktif-topragin-yeniden-kullanilabilir-ozellige-getirilmesi.html> [Erişim tarihi: Temmuz 2011].
- [4] Önen, V.Ç., Gökay, M.K. (2005). Sepiyolit ayçiçek yağının ağartılmasında ağartma toprağı olarak

kullanılması. *Selçuk Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 21, 1-2.

- [5] Gürpınar, G.Ç. (2011). Trakya Bölgesinden Elde Edilen Bentonitin Ayçiçek Yağının Ağartma Prosesinde Kullanılması. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- [6] Abak, O. (2016). Doğal ve İşlenmiş Killerin Bitkisel Yağların Rafinasyonunda Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Hitit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çorum.
- [7] AOCS. (1998). Official Methods and Recommended Practices Vol I and II. American Oil Chemists' Society, Urbana-Champaign, IL, USA.
- [8] Minitab. (2010). Minitab Statistical Software (Version 16.1.1). Minitab Inc., State College, PA.
- [9] Yılmaz, E., Erden, A., Güner, M. (2019). Structure and properties of selected metal organic frameworks as adsorbent materials for edible oil purification. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 96(3): 25-38.
- [10] Pomeranz, Y., Meloan, C.E. (1994). Food Analysis: Theory and Practice. Chapman & Hall, New York, ABD.
- [11] TGK. (2012). Türk Gıda Kodeksi Bitki Adı İle Anılan Yağlar Tebliğı (Tebliğ No: 2012/29). T.C. Resmi Gazete, 28262, 12 Nisan 2012, Ankara.
- [12] Worasith, N., Goodman, B.A., Jeyashoke, N., Thiravetyan, P. (2011). Decolorization of rice bran oil using modified kaolin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 2005-2014.
- [13] Sabah, E., Çınar, M., Çelik, M.S. (2007). Decolorization of vegetable oils: Adsorption mechanism of  $\beta$ -carotene on acid-activated sepiolite. *Food Chemistry*, 100, 1661-1668.
- [14] Sabah, E. (2007). Decolorization of vegetable oils: Chlorophyll-a adsorption by acid-activated sepiolite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 310, 1-7.

## A Plant-Based Milk Type: Hemp Seed Milk

Aysegul Besir<sup>1</sup>  ✉, Nour Awad<sup>1</sup> , Mustafa Mortas<sup>1,2</sup> , Fehmi Yazici<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department Food Engineering, Faculty of Engineering, Ondokuz Mayıs University, Samsun 55139, Turkey

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, The Ohio State University, 110 Parker Food Science and Technology Building, 2015 Fyffe Road, Columbus, Ohio 43210, United States

Received (Geliş Tarihi): 09.03.2022, Accepted (Kabul Tarihi): 16.06.2022

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): [aysegul.besir@omu.edu.tr](mailto:aysegul.besir@omu.edu.tr) (A. Besir)

☎ +90 362 312 19 19/1213 📠 +90 362 457 60 91

### ABSTRACT

Plant-based milk industry has been enlarged with increasing demand for plant milk types and their products. Demand is based on some factors such as vegan consumption, nutritional content, carbon emissions, lactose intolerance, and other factors. According to raw material, plant-based vegetable milk types can be divided into five categories as cereal-based (oat, rice, corn and spelt milks), legume-based (soy, peanut, lupine and cowpea milks), nut-based (almond, coconut, hazelnut, pistachio, walnut and cashew milks), seed-based (sesame, flax, hemp and sunflower milks) and pseudo-cereal based (quinoa, teff, amaranth and buckwheat milks). Hemp seed milk is one of the seed-based milks and it has high nutrition values because it is composed of lipids (1.25-5.00%), proteins (0.83-4.00%), carbohydrates (2.5-20.0%), vitamin E, minerals (sodium, phosphorus, potassium, magnesium, calcium, sulfur, iron, and zinc) and all essential amino acids with high in polyunsaturated fatty acids (linolenic acid and linoleic acid). This review evaluated hemp seed milk in comparing with other plant milk types, presented its nutritional aspect, and formed a perspective with current studies.

**Keywords:** Hemp, Hemp seed milk, Seed based milks, Plant based milks

### Bitkisel Sütlerden Biri: Kenevir Tohumu Sütü

#### ÖZ

Bitkisel süt endüstrisi, bitkisel sültere ve ürünlerine olan talebin artmasına bağlı olarak genişlemektedir. Söz konusu talepler temel anlamda vegan tüketim, besinsel içerik, karbon emisyonu, laktoz intoleransı ve diğer faktörler olmak üzere bazı hususlara bağlıdır. Bitkisel sülter hammaddelerine göre tahıl bazlı (yulaf, piriç ve mısır sütü), baklagil bazlı (soya, yer fıstığı, acı bakla ve börülce sütü), yemiş bazlı (badem, hindistan cevizi, fındık, fıstık, ceviz ve kaju sütü), tohum bazlı (susam, keten, kenevir ve ayçiçeği sütü) ve yarı-tahıl bazlı (kinoa, teff, amaranth ve karabuğday sütü) olmak üzere beş kategoriye ayrılmaktadır. Kenevir tohumu sütü, tohum bazlı sülterden biri olup; yağ (%1.25-5.00), protein (%0.83-4.00), karbonhidrat (%2.5-20.0), E vitamini, mineraller (sodyum, fosfor, potasyum, magnezyum, kalsiyum, kükürt, demir ve çinko), çoklu doymamış yağ asitleri (linolenik asit ve linoleik asit) ve esansiyel amino asit içeriği ile yüksek besinsel değere sahiptir. Bu çalışma, kenevir tohumu sütünün besleyici yönünün ortaya çıkarılması, diğer bitkisel sülterle karşılaştırılması ve güncel çalışmalarla bir bakış açısı oluşturulması için derlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kenevir, Kenevir tohumu sütü, Tohum bazlı sülter, Bitkisel sülter

## INTRODUCTION

Today, the increasing demand for plant-based milk expands the product variety and market size. The demand for the plant-based milk market was expected to reach a value of US\$ 13.24 billion in 2021 and is expected to reach an overall market value of US\$ 30.79 billion by 2031 [1]. Plant-based milk is one of the most popular vegan products due to various factors and perspectives. The factors are health issues, plant-based milk contains no lactose sugar, making it a favored alternative for customers with lactose intolerance, and it is free of animal hormones and cholesterol. Moreover, recent studies have established the significant role of plant-based milk in improving or enhancing the immune system, having potential antimicrobial effects, lowering the risk of cardiovascular and gastrointestinal diseases, lowering the risk of low bone mass, and having extremely high antioxidant levels with free radical scavenging properties [2]. Concerns regarding the use of animal products have also spurred ethical discussions. In terms of environmental concerns, it has been determined that the carbon emissions produced by the production of plant-based milk are significantly lower than those created by dairy milk production [3].

The sources of plant-based milk, can be divided into five categories as cereal-based (oat milk, rice milk, corn milk, spelt milk), legume-based (soy milk, peanut milk, lupine milk, cowpea milk), nut-based (almond milk, coconut milk, hazelnut milk, pistachio milk, walnut milk, cashew milk), seed-based (sesame milk, flax milk, hemp seed milk, sunflower milk) and pseudo-cereal based (quinoa milk, teff milk, amaranth milk, buckwheat milk) [4, 5].

Over the last several years, hemp and its derivatives (both edible and non-edible) have grown in popularity. The global hemp seed drink market was approximately USD 185 million in 2018 [6]. Since hemp and marijuana are both derived from the same plant, the Latin name *Cannabis Sativa* is used to describe useful or industrial hemp [7]. Industrial hemp contains only about 0.3% to 1.5% of delta-9 tetrahydrocannabinol (THC), the principal psychoactive compound, whereas marijuana contains 5% to 10% or more, and this is the main difference between both types [7]. Thus, the production of all these products from industrial hemp can be carried out with no issue related to illegality. This plant is used for many purposes, like the production of rope and textile [8], roof and wall materials [9], surgical materials [10], paper [11] food and medicine [12]. In addition, hemp seed can be used for producing different products with its sufficient nutritional value but without any illegal compounds.

Hemp seed milk is one of the important seed-based milk products; it is produced from industrial hemp. As previously said, demand for plant-based milk is increasing every day, but due to a lack of information and a generally unfavorable attitude toward discriminating between hemp and other cannabis types, the demand for hemp seed milk is insufficient and limited. The prejudice against hemp products has been

eliminated by studies in which THC analyzes hemp products in the market available. In the study conducted by Pisciotto et al. [13] the THC content of hemp seed milk was determined as <LOQ.

The primary goal of this study is to have a general perspective about hemp seed milk nutrient components and nutritional qualities, compare hemp seed milk characteristics to those of other plant-based milks and cow milk, as well as to discuss the methods and techniques employed in hemp seed milk production as have been explored in the literature. Moreover, to generate a future perspective for this promising product.

## MANUFACTURE AND STABILIZATION PROCESS OF HEMP SEED MILK

Plant-based milks are basically produced by extracting different raw materials (cereal, legume, nut, pseudo-cereal and seed) in water followed by homogenization and thermally treated to increase shelf life and to improve stabilization. Hemp seeds are marketed as hulled or whole. Furthermore, its derivatives such as its flour and oil are used worldwide as food and/or food additives [12, 14].

Hemp seed milk is made by homogenizing ground seeds in water (1:5 w/v), and the filtered milk, is generally heated for extended shelf life [15, 16]. Schematic presentation of hemp seed milk production is shown in Fig 1. Commercial stable hemp seed milk production is challenging since hemp seed milk as an oil-in-water (O/W) emulsion is unstable and prone to flocculation, coalescence, and creaming. This will result in a low-quality product with a short shelf life and lower consumer acceptance [15]. Therefore, exogenous emulsifiers and stabilizers are often used to improve the stability of emulsions to get stable hemp seed milk; however, using these additives is not cost-effective because it raises production costs and has some health concerns, such as chronic inflammatory diseases, obesity-related diseases, and metabolic disorders [2]. Therefore, there is a pressing need to produce hemp seed milk free of added chemical substances.

Hemp protein has a low emulsifying capacity since its structure is compact and it has poor water solubility [15], low emulsion stability index, and water-holding capacity [17]. In consequence, there have been many attempts to improve the emulsifying capacity of hemp protein by altering its original structure, such as 1) enzymatic hydrolysis [17] as they have noticed an improvement in the protein solubility of hemp protein after the application of limited enzymatic hydrolysis by trypsin enzyme, but there was a remarkable decrease in the emulsifying activity index [17]; 2) acylation, it has been reported that acetylation treatment improved the emulsifying activity indexes of hemp protein and aided in the formation of more soluble protein aggregate [17]. Further, hemp seed proteins have low heat stability and are affected and started to aggregate when exposed to heat treatment at 80°C or above for 10 min [18]. Since high temperatures induce denaturation and trigger the formation of large insoluble protein aggregate, literature

demonstrated that heating causes changing in the molecular structure of proteins, unfolding of the native tertiary structure, exposing of hydrophobic groups, and subsequent aggregation of the denatured molecules.

However, many factors affect the occurrence of protein aggregation, including protein concentration and heating conditions [18].

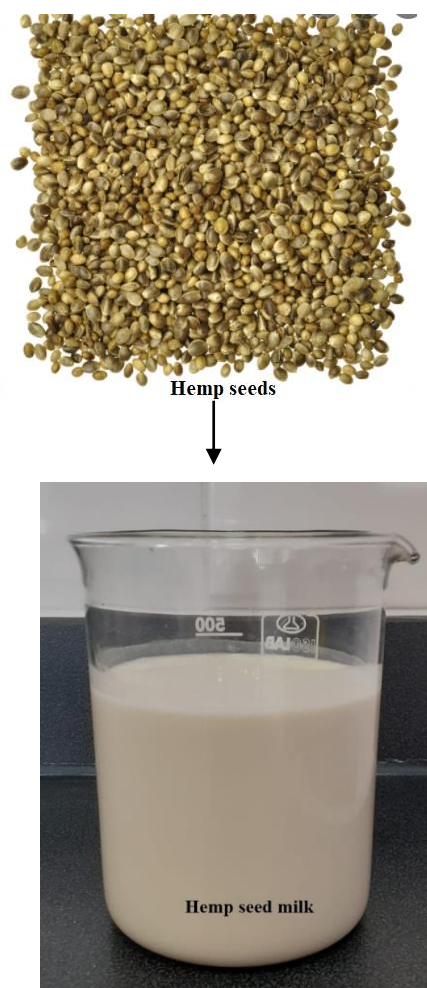
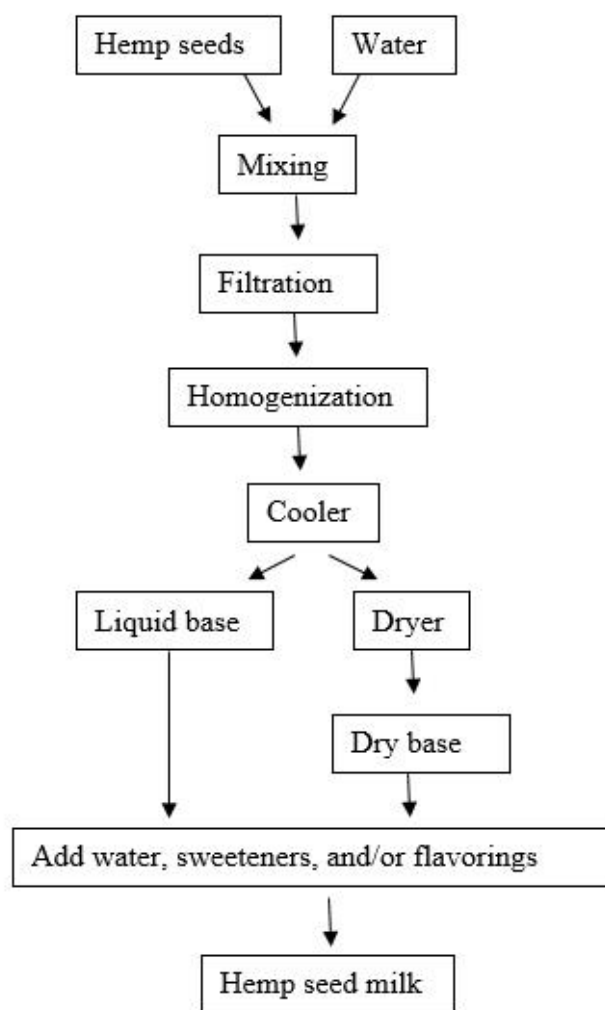


Figure 1. Flow chart of hemp seed milk production [16]

Accordingly, if heat stability and solubility of hemp proteins are to be preserved, heat treatments should ideally be kept below 80°C, according to the findings [18]. Thereupon these poor functional properties of hemp protein, the potential of producing stable commercial hemp seed milk is limited, as hemp seeds have approximately 25% protein of its total content [18].

Mitchell and Shammert [16] invented a novel method for producing commercial hemp seed milk. First, the production is carried out using seeds that have low levels of tetrahydrocannabinol (THC) (less than 0.3%). The hemp seeds have been mixed with water and hydrated into a slurry by absorbing water and being softened. After being waited in the mixing tank for a certain period, the hemp seed slurry is applied to wet milling, and the resulting slurry is recovered and circulated back to the mixing tank over and over for around ten minutes until reaching the desired consistency and maximum yields. Then a filtration step removes the shells, fibers, and other solid materials. After that, the filtered hemp slurry or milky mixture with

about 16% solids is homogenized for increasing the stability and resulting white creamy hemp seed milk. To stop the vitamins and oil oxidation, the hemp seed milk temperature was reduced in a cooler to under 10°C. Water, emulsifiers, stabilizers, sweeteners, and/or flavorings can be added. Finally, to extend the hemp milk's shelf life, aseptic processing involves sterilizing the product using an ultra-high temperature (UHT) treatment followed by sterile packaging. The advantage of the current invention is that it provides milk that is liquid, white, and high in essential fatty acids Omega 3 and 6, low in carbohydrate, and has a good flavor [19].

Berghofer et al. [20] hold a patent for the manufacturing of hemp seed milk. According to their method, to obtain hemp seed milk that has a stable color (never becomes grey), is free of bitter taste, and can be pasteurized and sterilized, the whole hemp seeds in a ratio of 15-25% are soaked for 5-12h in water at a temperature between 5-35°C. Then, water is used for the extraction, and the resulting raw hemp seed milk is separated from the remained solids of the hemp seeds [20]. A lot more

plainly, hemp seed milk has been produced in two different ways, 1) the hemp seeds are immersed in water for 5-12h and then grounded around 15 minutes. Afterward, milk extraction is carried out at a temperature below 80°C, or 2°C). Hemp seeds are crushed at temperatures ranging from 0°C to 80°C. After the extraction, obtained milk for 3-4 hours, additional cold extraction at a temperature between 0-10°C has been carried out. Latterly, the obtained extracted hemp seed milk is separated into peeling part which contains proteins and other hemp seeds particles, and raw hemp seed milk which can be sold directly to consumers or processed further, like applying homogenization, the addition of emulsifiers and flavors, pasteurization (60-93°C), or sterilization at a temperature above 100°C [20]. However, it is established that when performing mashing and extraction of milk at temperatures of 80°C and above, the coagulated proteins during the process do not extrude from the beginning; however, they are separated at the end of the line with other divided solid substances [20].

Recently, another novel processing method for producing non-thermally hemp seed milk without emulsifiers or stabilizers has been discussed in the literature. Wang et al. [15] applied the pH treatment combined with the high-pressure homogenization (HPH) process for producing hemp seed milk with high oxidative stability. This process disrupts the tertiary structure and generates a molten globule conformation with unique surface properties [2, 19]. Hence, this modifying method has been successfully applied before to improve different plant isolated proteins, such as soy protein [21], which demonstrated enhancement in the emulsifying activity and emulsion stability and pea protein [22].

In recent years, to produce stable O/W food emulsions, high-pressure homogenization (HPH) has been introduced [15]. The main principle of HPH is mechanically reducing the size of oil droplets, providing a uniform size distribution, and increasing the surface area, which all result in improved stability. Jiang et al. [22] examined the efficiency of combining pH arrangement and HPH techniques under 70 MPa high pressure to prepare pea protein-sunflower oil emulsions, and data showed an optimum physical and oxidative stability [22]. On the other hand, ultrasonic treatment has improved the extraction of phenolic and flavonoids from defatted hemp. The results indicated a two-fold increase in polyphenol extraction yield and antioxidant capacity compared to the traditional extraction approach. As a result, this technology helps industries reduce chemical consumption and extraction time while also extending the shelf life of hemp seed milk [23].

### NUTRITION PROFILE OF HEMP SEED MILK

In recent years, hemp seeds' nutritional content and minimal allergenicity have led to an upsurge in hemp product consumption. Hemp seed milk has been produced from the whole grain to get maximum nutritional value. Table 1 shows the composition of hemp seed and hemp seed milk. Hemp seeds contain

all essential amino acids and are high in polyunsaturated fatty acids such as  $\alpha$ -linolenic acid and linoleic acid, making them one of the best sources. Further, hemp seeds are mainly composed of lipids (25-35%), proteins (20-25%), carbohydrates (20-30%), insoluble fibers (10-15%), vitamin E (90 mg/100 gm) and minerals (sodium, phosphorus, potassium, magnesium, calcium, sulfur, iron, and zinc) [2]. The amount of B vitamins in hemp seeds is similar to that of other grains, but the quality and content of protein and fatty acids distinguish them [7].

Hemp seed milk contains around 0.83- 4% protein, 1.25-3% fat, and 2.5- 20% carbohydrate [19]. However, hemp seed milk's total saturated and polyunsaturated fatty acids are 0.428% and 4.173%, respectively [2].

Hemp seed protein is made of 65% high-quality edestin (globulin) protein, which is known as the most efficient plant-derived protein, with albumin protein and essential amino acids accounting for the other 35% [7]. All nine essential amino acids exist in hemp seeds, with a high abundance of sulfur-containing amino acids such as cysteine and methionine, which are often lacking in vegetable proteins. Further, the 3:1 omega-6 to omega-3 fatty acid (FA) ratio in hemp is nearly ideal for health and a good choice for vegans who don't eat animal products. Though linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid are the most abundant fatty acids (80-90 g/100g of their total fatty acids) [2] hemp also contains both polyunsaturated gamma-linolenic acid (GLA; omega 6) and stearidonic acid (omega-3). As well as, it's worth mentioning that hemp seed is mercury-free [7].

Hemp seed milk is unsweetened and unflavored and has roughly 60 calories per serving, which is less than cow's milk [24]. On the other hand, one cup (244 gram) of cow milk contains 12 g of carbohydrate from the naturally occurring sugar lactose [24]. However, hemp seed milk's general characteristics have a thick and creamy structure, a nuttier taste or flavor, which is similar to the taste of soy or rice milk. Besides, hemp seed milk is free of soy, gluten, cholesterol, trans fat and lactose and is low in sodium [7]. Hemp seeds have been used for human nutrition in various ways, such as hemp seeds products (oil, flour, milk, bakery products, chocolate, beer, etc.).

### COMPARISON OF HEMP SEED MILK WITH OTHER PLANT MILK TYPES

Plant-based milks are naturally lactose-free, cholesterol-free and animal protein-free, making them a good alternative for people fed with some special diet. In addition, thanks to the bioactive components, antioxidants, monounsaturated and polyunsaturated fats components they contain, they are considered functionally valuable products as well as nutritional value. Contrary to all these positive features, they reduce the nutritional value of foods because of anti-nutritional factors included. They are enhanced with vitamins and minerals because of low vitamin and mineral content [25]. Although they are called milk because they often resemble cow's milk in appearance,



plant-based milks may have different nutritional content in cow's milk depending on the type of raw material from which they are derived, the method of production and whether they are enriched or not. For this reason, plant-

based milk should not be considered as a cow's milk alternative without proving its nutritional quality and bioavailability [26].

Table.1. Composition of hemp seed and hemp seed milk [2, 19]

		Hemp seed	Hemp seed milk			Hemp seed	Hemp seed milk
Composition (%)	Ash	6.99	0.47	Amino acids (g/100 g protein)	Alanine	4.26	5.20
	Protein	25	0.83-4		Arginine	13.93	13.56
	Carbohydrate	20	0.3-20		Cysteine	6.15	n.d.*
	Fat	30	1.25-4.61		Glutamic acid	14.68	16.49
	Crude fiber	8.3	0.4		Glycine	4.4	4.74
	Moisture content	6.0	91.6		Histidine	3.89	3.62
	Energy value Kcal/100g	456.84	19-53.09		Isoleucine	3.85	4.07
Vitamins, (mg/g)	E	30.1	0.42		Leucine	6.78	6.46
	C	14.4	2.1		Lysine	3.31	3.62
	B <sub>1</sub>	9.3	1.1		Methionine	6.7	5.42
	B <sub>2</sub>	10.7	0.8		Phenylalanine	3.96	4.07
	B <sub>3</sub>	25.1	2.4		Proline	3.96	4.97
	B <sub>6</sub>	3.1	0.03		Serine	3.65	3.84
Fatty acid composition (%fat)	Palmitic (C 16:0)	6.2	6.5		Threonine	2.84	3.39
	Stearic (C 18:0)	2.5	2.4	Tyrosine	2.94	3.62	
	Oleic (C 18: 1)	9.9	10.2	Valine	4.43	5.65	
	Linoleic (C 18:2)	55.2	57.1	Cu	15.75	0.09	
	Gammalinolenic (C 18:3 n-6)	2.8	2.1	Cd	0.12	0.01	
	Alfalinolenic (C1 18: 3 n-3)	21.3	19.8	Pb	1.50	0.02	
	Stearidonic (C 18:4 n-3)	1.2	1.2	Zn	55.35	5.96	
	Arachidic (C 20:0)	0.6	0.4	Hg	0.02	0.01	
	Eicosenoic (C 20: 1)	0.3	0.25				

\*n.d.: Not detected.

With the increasing interest in hemp, hemp products are also being researched. In addition to representing a food on its own, plant-based milk may have more potential to be purchased than other product types since it is used as a basic raw ingredient in the manufacture of many foods (coffee, tea, smoothies, ice cream, yogurt, cheese, butter, cake, desserts). Since plant-based milk are enriched with different components, it is not easy to compare the nutritional composition. This study has been tried to create a general point of view by giving the minimum and maximum values obtained by some studies in the tables.

Proteins are essential structures for cells and play an important role in the progress of life by participating in the structure of enzymes, hormones, nucleic acids, and many other molecules. Compared to cow's milk, soy milk and hemp seed milk are the closest to cow's milk in terms of protein ratio (Table 2). Oat milk has the highest average protein content among plant-based milk.

Singhal et al. [26] compared the nutrient content of non-dairy beverages to that of cow's milk according to the recommended dietary allowance (RDA) or adequate intake for toddlers (1–3 years) and young children (4–6 years). While one serving (240 mL) of cow's milk provides protein equivalent to 59% of the RDA in

toddlers (1-3 years) and 40.4% of the RDA in young children (4-8 years), soy milk, which is closest to cow's milk, ensures protein equivalent to 53% and 36.8% of RDA in toddlers and young children, respectively. Hemp seed milk provides protein equivalent to 15% of the RDA in toddlers and 10.5% of the RDA in young children.

The nutritional importance of proteins is measured by their quality, which depends on the amino acid composition, digestibility, and bioavailability. PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) and DIAAS (digestible indispensable amino acid score) introduced by WHO in 1998 and by FAO in 2013, respectively, are used to assess protein quality based on *in vivo* experiments. While the PDCAAS and DIAAS value closest to cow protein is in soy protein, the DIAAS value of de-hulled hemp seed protein has been reported as 66.5%. Materials with a DIAAS value of 75 are qualified as a "good protein source," while those with a value above 100 are considered an "excellent source of protein" by the FAO [34]. While cow's milk has >100% DIAAS values, plant-based milk is likely to have a low PDCAAS or DIAAS due to the limiting amino acid contents of methionine, cysteine, and/or lysine [34]. Hemp seed protein has lower PDCAAS values than soy milk but higher than almond and oat milk (Table 3).

Table 2. General composition of plant-based milks

	Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Quinoa milk	Cow milk
Protein, %	0.83-6.96	0.78- 17.30	2.6-3.98	0.42-2.50	0.49-2.9	2.9-3.32
Fat, %	1.25-18.02	0.28-12.40	1.47-13.92	1.04-8.26	0.91-2.40	3.40-6.40
Total carbohydrate %	0.3-30.21	4.44-50.01	4.14-5.06	0.58-9.38	3.5-12	3.20-5.40
Ash, %	0.47	0.48	0.71-0.87	3.04	0.11-0.22	0.67-1.9
Energy (kcal)	19-53.09	66-607.10	43-95	15-55.90	29-62	63-118
Total sugar, %	2.5	1.27	3.65	0	9.7	3.38
Total Fiber, %	0-0.4	0.8-20.07	0.2-0.74	0-1.35	0.5	0

Data from Paul et al. [2], Rasika et al. [27], Reyes-Jurado et al. [4], Chichowska et al. [19], Aydar et al. [28], McClements et al. [29], Kanberoglu [30], Martinez-Padilla et al. [31], Pineli et al. [32], Makinen et al. [33], Reyes-Jurado et al. [4].

Table 3. Comparative overview of the essential amino acid profile of plant-based milk

		Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Cow milk
Essential amino acid (mg/100g)*	Isoleucine	3.90-4.40	4.15-4.41	1.41-2.47	29.8-39	25-62
	Leucine	6.50-7.10	7.89-9.17	2.94-4-24	83-83.20	90-108
	Lysine	4-4.60	3.79-3.91	0.88-3.92	36.20-57.4	49-96
	Methionine	2.10-2.80	1.73-1.93	0.31-0.85	27.10-27.95	17-27
	Phenylalanine	4.6-4.90	5.46-5.48	1.86-2.79	50.90-50.55	38-56
	Threonine	2.60-3.90	3.25-4.30	0.87-2.09	30.2-43.4	23-41
	Tryptophan	0.70-0.90	3.61-4.09	0.3-0.8	13.9-13.98	N.R.
	Valine	5-5.70	5.34-6.01	1.32-2.59	38.30-73.60	33-53
In vitro based values (%)**	PDCAAS, %	63-66	58-69	86-100	23	100
	DIAAS, %	N.R.	56-67	84-90.6	N.R.	118-120
In vitro protein digestibility (%) ***	Pepsin 1h digestibility	4.70	5.55	5.96	4.82	5.06
	Pancreatin 1h digestibility	17.03	19.39	14.61	20.28	21.37
	Total 2 digestibility	21.73	24.95	20.56	25.19	26.43

Data from \*Paul et al. [2], \*\*Chalupa-Krebzdak et al. [34], \*\*Abelilla et al. [35], \*\*\*Martinez-Padilla et al. [31]

Martinez-Padilla et al. [31] researched in vitro protein digestibility (IVPD) of selected commercial plant-based milk alternatives. After 1-h incubation with the pepsin enzyme, the IVPD value of soy milk was significantly higher than hemp seed milk. However, IVPD of hemp seed milk is not statistically different from cow's milk. As

a result of digestion with pancreatic enzyme after gastric phase, soy milk had the lowest IVPD value followed by hemp drink. That study showed that after pepsin and pancreatin digestion (total 2 hours), the IVPD value of soy drink and hemp drink were the lowest.

Table 4. Fatty acid profiles of commercial plant-based milk alternatives (g/100 g total fatty acids by product)

Compounds	Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Quinoa milk	Cow milk
SFA	12.32	18.88	14.34	22.64	10.1	68.4
MUFA	13.94	37.26	22.64	59.14	65.48	23.8
PUFA	73.73	43.85	63.02	18.21	24.42	2.21
w-6/w-3	≈ 3.43	≈ 24.64	≈ 7.52	≈ 133	≈ 19.34	≈ 3.43

Data from Martinez-Padilla et al. [31]. SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids

Like other members of its group, hemp seed milk is higher fat milk than other plant-based milk (Table 2). Compared to cow's milk, plant-based milk has lower saturated fatty acids but a higher unsaturated fatty acid profile (Table 4). It is reported that a food with a higher ratio of unsaturated fatty acids instead of saturated fatty acids is beneficial for LDL cholesterol. It is known that decreasing blood lipid concentration has a positive effect in treating Alzheimer's disease [28, 34]. Martinez-Padilla et al. [31] conducted a study to determine the fatty acids profile and in vitro protein digestibility (IVPD) score of eight commercially available plant-based milk (almond, coconut, oat, hazelnut, quinoa, rice, soy, and cow milk). Among plant-based milk, hemp seed milk contains high levels of unsaturated fatty acid. Hemp seed milk is characterized by a low content of saturated fats and a good percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFA) with a content of 74%. Oleic acid (C18:1, w-9, omega 9) linoleic acid (C18:2, w-6, omega 6) were

the greatest source of fatty acids for hemp drinks. Additionally, they reported that hemp drink was the only milk among the analyzed milk that had a source of  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3, w-3, omega 3) with a content of 16%. Considering the w-6/w-3 ratio (recommended by EFSA in the ranges from 1:1 to 5:1 for a healthy diet), hemp drink was the most similar drink to cow's milk with a ratio of 3.43 (Table 4). Imbalance in the w-6/w-3 ratio can cause some chronic degenerative diseases, such as cardiovascular disease and obesity, mental disease specifically with mood disorders and depression in adults [36, 37]. When examined in terms of fiber content, oat milk has a higher dietary fiber content (especially  $\beta$ -glucan) than other milk [5].

Table 5 shows major minerals of some plant milks. Astolfi et al. [38] had a study in which major, minor, and trace elements were determined in dairy milk and plant-based milk alternatives from an Italian market.

According to their study, soy milk contains the closest major elements to cow's milk. They reported that soy milk for Fe and Cu and hemp milk for Mo had a good contribution to the daily nutrition of consumers in terms of minor elements intake. When hemp seed milk was examined in terms of major elements, element K was found at the highest rate. The closest K ratio to cow's milk was in soy milk, followed by hemp seed milk. In addition, plant-based milk containing the most Mg element after soy milk was hemp seed milk [6].

Additionally, The most common ingredients used for the fortification of hemp seed milk were tricalcium phosphate, vitamin A palmitate, vitamin D2 (Ergocalciferol), vitamin B12 [4]. As can be seen in Table 5, among the plant milks, hemp seed milk can be shown as a good source of calcium. However, when hemp seed milk is to be consumed as an alternative to cow's milk, it should be enriched in minerals, especially major calcium elements [4].

Table 5. Major minerals of some plant milks (ppm)

Mineral	Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Quinoa milk	Cow milk
Ca	120-1250	174-856	1200-1230	130.5-202	118.9	1220-1340
K	982-1265.8	394-6710	1000-2150	230-670	224	1490-1810
Mg	121-170.8	60-420	142-150	70-95	32.7	111
Na	130-1400.1	364	22-470	383-710	410	346-580
P	212-639.8	147-8163	311-626	214-750	73.5	481-1210

Data from Astolfi et al. [38], Paul et al. [2], Reyes-Jurado et al. [4]

Color is a feature that should be considered in the formulation development of new plant-based milk. Especially if the product is to be recommended as a cow milk replacer, it should have similar values to cow's milk. The white index calculated using color values (L, a, b)

can be used as a good indicator for comparison. While the closest whiteness index value to cow's milk is in quinoa milk, natural pigments in raw materials used are shown as the reason for the difference in other milk types (Table 6) [29].

Table 6. Comparison of physicochemical properties for plant milk types

Properties	Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Quinoa milk	Cow milk
Viscosity, mPas ( $10s^{-1}$ )	25	6.77	4.91	13.48	13.20-23.8	3.15
Whiteness Index	68.49	60.21	72.17	67.36	73.52	81.89-89.18
pH	6.81-6.92	7.16	6.8-7.39	5.72-6.92	5.9-6.5	6.42-6.83

Data from McClements et al. [29], Gram [39], Kanberoglu [30], Huang et al. [40], Jeske et al. [41], Makinen et al. [33], Lai et al. [42]

Vaikma et al. [43] investigated the volatile compounds and sensorial characteristics of 90 different plant-derived milk in Estonian markets. Hemp beverage possessed a hay-like odor and astringent taste. With GC-O analysis, the highest alcohols and ketones content were determined in hemp drinks. These compounds may have affected odor by causing hay-like

characteristics, as was described by the sensory analysis. Hemp drink also stands out with p-cymene (spicy, phenolic, clove) content, known as phenolic and spicy in odor. This compound may increase astringency and intensify the aftertaste. Furthermore, it was suggested that the specific hemp flavor was caused by different terpenes in that study (Table 7).

Table 7. The number of volatile compounds of plant milks

Compound	Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Quinoa milk
Acids	0	20	11	3	11
Alcohols	915	134	263	248	26
Aldehydes	359	170	129	3195	124
Ketones	91	44	61	48	8
Esters	9	35	52	57	1
Lactones	0	0	19	39	0
Aromatic/cyclic comp.	48	48	756	342	106
Sulfur compound	2	2	2	1	0

Data from Vaikma et al. [43]

Nissen et al. [6] conducted a study to improve the taste and aroma of hemp seed drinks by fermentation with beneficial lactobacilli and or probiotic bifidobacteria. The aldehyde ratio was found to be highest in unfermented hemp seed milk. While the alcohol, alkane, and ketone ratios increased, the aldehyde ratios decreased with the fermentation process. According to GC-MS analysis 2-heptanol, 2-methyl, 2,4-decadienal, 2-butanone, 3-hydroxy, 2,3-butanedione, 2-methyl, 1-octen-3-ol, cyclohexanol, propanoic acid, caprylic acid and

pelargonic acids were detected in hemp seed drink matrices.

No study was found in which antinutritional factors were detected in direct hemp seed milk. However, antinutritional components such as phytic acid, trypsin inhibitors, condensed tannins, cyanogenic glycosides, and saponins have been reported in hemp seeds as in other edible seeds [44]. Table 8 shows the limitation and antinutrients factors of plant-based milk types. Phytic

acid is considered as an antinutritional factor in cereal and legume-based milk because it reduces the bioavailability of some minerals (calcium, zinc, iron, magnesium, and copper), creating insoluble complexes.

Since lectins prevent glucose absorption and saponins form saponin-protein complexes in foods included, they are also shown as antinutritional factors [34].

Table 8. Limitation factors for plant milk types

	Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Quinoa milk	Cow milk
Limitations	-Toxicity in high dosage and act against inhibiting inflammatory cytokines production	-Lacks calcium content -Poor emulsion stability due to high starch content -Contain potential allergens -Presence of inhibitors phytates - Lysine is a limiting amino acid -Low calcium content -High amount of lipases that can promote its rancidification	-Formation of hormone-responsive tissues -Reduce testosterone concentration in men -Undesirable beany flavor due to lipoxygenase activity on unsaturated fatty acids -Presence of inhibitors -Methionine and cysteine are limiting amino acids	-Almond allergy -Limited cariogenic properties in the presence of sucrose -Very low protein -Supports growth of pathogenic micro-organism -Presence of proteins with allergenic potential. -Methionine and cysteine are limiting amino acids -Susceptibility to rancidification due to its high concentration of polyunsaturated fatty acids.	-Bitter taste due to the presence of saponins	-Lactose intolerance -Limited availability -Iron, vitamins like folate, and some amino acids deficiency -High price -Presence of pathogens -Cow's milk protein allergy
Antinutrients	-Phytic acid (seed)	-Phytic acid	-Trypsin inhibitor -Phytic acid, -Saponin -Lectin		-Saponin -Phytic acid	

Data from Sethi et al. [5], Paul et al. [2], Silva et al. [45], Bocker et al. [25], Chalupa-Krebsdak et al. [34]

When considering about the effects of foods on health, this effect is associated with the bioactive components they contain. It is the cannabinoids that stand out as the bioactive component of hemp seeds. However, the number of available research on examining the health benefits of consuming hemp seed milk is very limited and the scientific literature on this milk is hardly available. Table 9 shows bioactive components and health-related substances of plant based milks.

In general, hemp seeds have medicinal properties in four areas: cardiovascular, mental health, dermatological, and the immune system [24]. Besides, hemp seeds have a low glycemic index for diabetics due to their low carbohydrate content. Hemp has many health benefits, the most notable of which are increased energy, cholesterol regulation, improved circulation, immunological and nervous system strengthening, rapid recovery from injuries, reduced stress, and reduced symptoms of atopic dermatitis and allergies [24]. The high hemp content of soluble fiber helps to maintain the digestive tract healthy and clean [16]. Studies also showed that hemp seeds have anti-cancer properties because it contains many plant sterols and antioxidants (useful in reducing the risk of colon, breast, and prostate cancer) [24]. Additionally, hemp has been shown to help

prevent illnesses like Parkinson's and Alzheimer's and boost memory. Also, hemp is recommended for the treatment of premenstrual syndrome (Menopause) because of its gamma-linoleic acid content, for Joint diseases, reducing stress because of its magnesium and high-quality proteins. Skin health like treating psoriasis or eczema, etc., further, hemp has been found to be effective in maintaining nervous system homeostasis [24]. Hemp seed milk has the advantage of not containing any milk proteins or the milk sugar lactose, making it suitable for people with cow's milk allergies or intolerances [4]. Chichowska et al. [19] investigated the effect of hemp seed milk consumption on body weight gain, internal organs weight, insulin and thyroid hormones serum concentration and blood lipid indices in rats. The study was carried out on 40 female Wistar rats for 21 days. The findings revealed that consumption hemp seed milk lowers blood triglycerides and cholesterol levels. Furthermore, thyroid hormone levels in experimental rats were found to be much lower [7]. Based on what has been mentioned, hemp and hemp seed milk are thought to be a promise for the future as a nutritious and healthful non-dairy alternative milk. However, more research is still needed and encouraged to understand its positive benefits on human health better.

Table 9. Functional properties-Bioactive components of plant milk types

Factors	Hemp seed milk	Oat milk	Soy milk	Almond milk	Quinoa milk	Cow milk
Bioactive components	Linolenic acid, Linoleic acid, $\gamma$ -tocopherol, Cannabidiolic acid, Lignanamides	B-glucan, Phytochemicals: Avenanthramides(AVAs), Avenacosides A and B, Phytosterols	Genistein, Daidzein, Glycitein, Isoflavones, Phytosterols, $\alpha$ -tocopherol	Beta-sitosterol, campesterol, stigmaterol folate, vitamin E, niacin, arabinose, flavonoids and phytosterols, alpha-tocopherol		IgG, IgA, Casein, Lactoferricin
Health benefits	-Reduce both motion- and toxin- induced vomiting -Anti-thrombotic, anti-vasoconstrictive, anti-inflammatory, anti-neuro-inflammation activity	-Hypocholesterolaemic -Reduce blood glucose level -Increases solution viscosity and can delay gastric emptying time -Anti-pathogenic effect -Reduction of postprandial glycemic response because of the increasing of gastrointestinal transit -Reduction of total and LDL cholesterol	-Decrease blood pressure level -Hypolipidemic effects -Effective against chronic disease -Recommended against osteoporosis and cardiovascular diseases -Higher bone density and lower rates of fracture - $\alpha$ -galactosidase activity -Alleviate menopause symptoms -Decrease the risk of prostate, breast, and colon cancer	-Powerful antioxidant -Low calorie -High in Vit E -Prebiotic properties -Lowers plasma LDL cholesterol level -Decreases plasma LDL level -Decreases lipid peroxidation -Improves gastrointestinal health		-Considered as a wholesome complete food - Antimicrobial activity -Helps in overall growth and maintenance of the body system -Helps in decreasing blood cholesterol levels due to the presence of hypocholesterolemic peptides
Total phenolic content			-8.79 mg GAE/100g (Folin-Ciocalteu) -61.4 mg/100 mL (Folin-Ciocalteu)	1.24 mg GAE/L	4.39 mg GAE/kg	
Antioxidant activity			%17 (DPPH)	%2 (serum retention capacity)	0.34 mM Trolox (DPPH)	

Data from Paul et al. [2], Reyes-Jurado et al. [4], Aydar et al. [28], Sethi et al. [5]

## RECENT STUDIES RELATED TO HEMP SEED MILK

Szparaga et al. [46] investigated whether hemp and coconut milk could be a suitable food matrix for probiotic bacteria. They reported that the fermentation process (at 37°C for 6 h) contributed to the increased survival rates of *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* in both coconut and hemp seed milk. After the fermentation process the total count of viable lactic acid bacteria (LAB) cells increase from 11.72 log (cfu/mL) to 13.26 in coconut beverage and from 8.41 log (cfu/mL) to 10.92 log (cfu/mL) in hemp beverage. On day 21 of cold storage (+4°C), the number of viable *Lactobacillus casei* cells in the fermented coconut and hemp seed milk ensured meeting the therapeutic criterion (>6 log (cfu/mL)). Zhu et al. [47] examined the effect of heat treatment on the stability and protein structure of hemp seed milk. They showed that with the increase in heat

treatment temperature (55–95°C), the nitrogen solubility index (NSI) decreased from 58.55% to 39.81%, the centrifugal precipitation rate increased from 16.58% to 34%, and the average particle size increased from 192.2 nm to 304.6 nm. When they examined the results of FTIR analysis, they understood that the secondary structures of hemp seed milk proteins changed with the increase in heat treatment temperature. Furthermore, they observed the maximum absolute value of zeta potential of 20.57 mV when hemp seed milk was treated at 65°C, accompanied by the best stability and the highest emulsification activity and emulsification stability with emulsifying activity index (EAI) of 0.357 m<sup>2</sup>/g and emulsion stability index (ESI) of 43.74%. Lai et al. [42] conducted a process optimization study to produce fermented hemp seed milk. As a result of the research, they suggested the best fermentation conditions as follows: the ratio of *Lactobacillus bulgaricus*: *Streptococcus thermophilus*: *Lactobacillus casei*:

*Streptococcus acidophilus* was 2:2:1:1.78, the inoculation amount was 6.21%, the fermentation temperature was 39.42°C, and the fermentation time was 7.12 h. At the proposed point, they found that the viable count was  $1.9 \times 10^8$  CFU/mL, the acidity value was 78 T°, and the sensory score was 8.74. The total sugar and total solid content of fermented hemp seed milk were determined 69.29 mg/mL and  $6.08 \pm 0.22$  g/100 g, respectively. They reported that the contents of flavonoids and the antioxidant activity was significantly improved. While hemp seed milk contains most of the original nutrients, hemp protein is known for its low emulsifying capacity due to its compact structure and poor water solubility. In order to improve this negative feature, Bartkiene et al. [48] produced fermented hemp drinks by fermenting hemp seed paste emulsion with different microorganisms (*Pediococcus acidilactici* LUHS29, *P. pentosaceus* LUHS183, *Lactobacillus casei* LUHS210 and *L. uvarum* LUHS245 strains) and applying ultrasonication at the same time. They proposed that hemp seed beverages, with more stable emulsion and the highest overall acceptability (9.6 points), can be obtained using LUHS245 strain and ultrasonication treatment.

Gram [39] was applied ultrasound and homogenization process to hemp seed milk to prevent or delay the phase separation problem without adding additives. It was reported that the lowest amount of serum separation achieved was found applying homogenization (40 MPa) combined with ultrasonication (20% amplitude for 2 minutes). When it was examined the effects of ultrasound and homogenization process separately, the optimum parameters of the ultrasound process was determined as 50.2% amplitude and 6.40 minutes. Furthermore, it was reported that ultrasound application increased the  $L^*$  value of hemp seed milk and decreased the amount of syneresis and serum separation statistically ( $p < 0.05$ ). When homogenization application was evaluated, it was reported that while  $L^*$  value increased,  $a^*$ ,  $b^*$  value, serum separation (%) (phase separation by gravity force), syneresis (%) (phase separation by centrifuge force), and particle size decreased ( $p < 0.05$ ) also color and physical stability were positively affected. Wang et al. [15] wanted to produce a non-thermally processed, physically and oxidatively stable hemp seed milk. For this purpose, they researched the effects of high-pressure homogenization (HPH) combined with pH shift treatment on hemp seed milk. According to their results, applying pH shift combined with HPH the formation of hydroperoxides and malondialdehyde was delayed and the microbial population was decreased. Nissen et al. [6] produced innovative prebiotic and probiotic plant-based drinks based on hemp seed and fermentation process. In that study, the new formulations of commercial hemp seed-derived drink to be fermented with probiotics (*Lactobacillus fermentum*, *Lb. plantarum*, and *Bifidobacterium bifidum*). They also blended hemp seed milk with some other plant-based milks (soy and rice milk) to meet the demand for alternative and possibly healthier novel matrices. Zhu et al. [47] investigate the effect of heat treatment (55–95°C) on hemp seed milk's stability and protein structure. It has been reported that

as the temperature is increased, the structure of the proteins changes with a decrease of the relative content of  $\alpha$ -helix. In addition, as the temperature is increased, the centrifugal precipitation rate and the average particle size increase while the nitrogen solubility index decreases. Although there are studies (but not enough) examining how the technological properties of hemp seed milk change with some processes, there are still very few studies on its bioavailability by human and animal experiments. A study made by Chichowska et al. [19] demonstrated that hemp seed milk leads to a significant decrease in triglycerides and cholesterol blood content of intragastric treated rats.

## CONCLUSION

Although soy milk is the most known milk type, the market in question is expanding with new plant-based milk and dairy products day by day. Nowadays, the consumption of animal milk and its market values is decreasing. However, the decrease in question is not the problems in accessing animal milk or the decline in purchasing power but the increase in consumption of plant-based milk. Hemp seed milk is one of the products of this product range and it has become popular with its high nutritional values. Although the presence of the psychoactive substance adversely affects the consumption of hemp seed milk, it is understood over time that the reservation in question is unfounded, as the consumer is informed. Getting more knowledge of hemp seed milk can ensure its enlarged market. New research should have occurred about hemp seed milk and hemp seed milk products from this perspective.

## REFERENCES

- [1] Future Learn Insights (FLI). <https://www.futuremarketinsights.com/reports/sample/rep-gb-13818>. Access date: 6 March 2022.
- [2] Paul, A.A., Kumar, S., Kumar, V., Sharma, R. (2020). Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3005-3023.
- [3] Tangyu, M., Muller, J., Bolten, C.J., Wittmann, C. (2019). Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 103(23-24), 9263-9275.
- [4] Reyes-Jurado, F., Soto-Reyes, N., Dávila-Rodríguez, M., Lorenzo-Lea, A.C., Jiménez-Munguía, M.T., Mani-López, E., Lopez-Malo, A. (2021). Plant-Based Milk Alternatives: Types, Processes, Benefits, and Characteristics. *Food Reviews International*, 1-32.
- [5] Sethi, S., Tyagi, S.K., Anurag, R.K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3408-3423.
- [6] Nissen, L., di Carlo, E., Gianotti, A. (2020). Prebiotic potential of hemp blended drinks fermented by probiotics. *Food Research International*, 131:109029.

- [7] Vahanvaty, U.S. (2009). Hemp Seed and Hemp Milk. *ICAN: Infant, Child, & Adolescent Nutrition*, 1(4), 232-234.
- [8] Cassano, R., Trombino, S., Ferrarelli, T., Nicoletta, F.P., Mauro, M.V., Giraldi, C., Picci, N. (2013). Hemp fiber (*Cannabis sativa* L.) derivatives with antibacterial and chelating properties. *Cellulose*, 20(1), 547-57.
- [9] Gonen, S. (2009). *Cannabis sativa* L. bitkisinin morfolojisi ve anatomisi üzerine bir araştırma. Master Thesis Ege University.
- [10] Gu, L.F. (2006). Surgical sewing free zipper made of antibiotic material hemp fiber. CN Patent Y, 2829641.
- [11] Aytaç, S., Ayan, A.K., Arslanoğlu, Ş.F. (2017). Keten-Kendir-Isırgan. Endüstriyel Tip Kenevir Yetiştiriciliği Karadeniz Lif Bitkileri Çalıştayı. Karadeniz Lif Bitkileri Çalıştayı (5-6 Mayıs), Samsun. 27-35.
- [12] Kladar, N., Čonić, B.S., Božin, B., Torović, L. (2021). European hemp-based food products – Health concerning cannabinoids exposure assessment. *Food Control*, 129, 108233.
- [13] Di Marco Pisciotto, I., Guadagnuolo, G., Soprano, V., Esposito, M., Gallo, P. (2021). A survey of  $\Delta^9$ -THC and relevant cannabinoids in products from the Italian market: A study by LC-MS/MS of food, beverages and feed. *Food Chemistry*, 346, 128898.
- [14] King, J.W. (2019). The relationship between cannabis/hemp use in foods and processing methodology. *Current Opinion in Food Science*, 28, 32-40.
- [15] Wang, Q., Jiang, J., Xiong, Y.L. (2018). High pressure homogenization combined with pH shift treatment: A process to produce physically and oxidatively stable hemp milk. *Food Research International*, 106, 487-494.
- [16] Mitchell, R., Shammiet, K.M.(2008). Hemp food product base and processes. Patent No: US20080241339A1.
- [17] Yin, S.W., Tang, C.H., Wen, Q.B., Yang, X.Q. (2009). Functional and structural properties and in vitro digestibility of acylated hemp (*Cannabis sativa*L.) protein isolates. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2653-2661.
- [18] Raikos, V., Duthie, G., Ranawana, V. (2015). Denaturation and oxidative stability of hemp seed (*cannabis sativa* l.) protein isolate as affected by heat treatment. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 304-309.
- [19] Chichowska, J., Kliber, A., Kozowska, J., Biskupski, M., Grygorowicz, Z. (2002). Thyroid hormone and metabolic changes after treated rats with hemp milk. <http://www.hempreport.com/pdf/HempMilkStudy%5B1%5D.pdf>. Access date: 25 December 2021.
- [20] Berghofer, E., Pollmann, K., Traby, M., Frenkenberger, C. (2006). Method for producing hemp milk. Patent No: RU2341093C2.
- [21] Jiang, J., Chen, J., Xiong, Y.L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7576–7583.
- [22] Jiang, J., Zhu, B., Liu, Y., Xiong, Y. (2014). Interfacial structural role of pH-shifting processed pea protein in the oxidative stability of oil/water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1683-1691.
- [23] The, S.S., Birch, E.J. (2014). Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 346-353.
- [24] Curl, S., Rivero-Mendoza, D., Dahl, W.J. (2020). Plant-based milks: Hemp. EDIS. 5.
- [25] Bocker, R., Silva, E.K. (2022). Innovative technologies for manufacturing plant-based non-dairy alternative milk and their impact on nutritional, sensory and safety aspects. *Future Foods*, 5, 100098.
- [26] Singhal, S., Baker, R.D., Baker, S.S. (2017). A Comparison of the nutritional value of cow's milk and nondairy beverages. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 64(5), 799-805.
- [27] Rasika, D.M.D., Vidanarachchi, J.K., Rocha, R.S., Balthazar, C.F., Cruz, A.G., Sant'Ana, A.S., Ranadheera, C.S. (2021). Plant-based milk substitutes as emerging probiotic carriers. *Current Opinion in Food Science*, 38, 8-20.
- [28] Aydar, E.F., Tutuncu, S., Ozcelik, B. (2020). Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. *Journal of Functional Foods*, 70, 103975.
- [29] McClements, D.J., Newman, E., McClements, I.F. (2019). Plant-based milks: A review of the science underpinning their design, fabrication, and performance. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(6), 2047-2067.
- [30] Kanberoglu, B.N. (2021). Use of quinoa beverage and flour as replacement of cow's milk and skimmed milk powder in ice cream production. Master Thesis. Institute of Graduate Studies, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey (in Turkish).
- [31] Martinez-Padilla, E., Li, K., Blok Frandsen, H., Skejovic Joehneke, M., Vargas-Bello-Perez, E., Lykke Petersen, I. (2020). In vitro protein digestibility and fatty acid profile of commercial plant-based milk alternatives. *Foods*, 9(12), 1784.
- [32] Pineli, L.D.D., Botelho, R.B.A., Zandonadi, R.P., Solorzano, J.L., de Oliveira, G.T., Reis, C.E.G., Teixeira, D.S. (2015). Low glycemic index and increased protein content in a novel quinoa milk. *Lwt-Food Science and Technology*, 63(2), 1261-1267.
- [33] Makinen, O.E., Uniacke-Lowe, T., O'Mahony, J.A., Arendt, E.K. (2015). Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactose free bovine milk. *Food Chemistry*, 168, 630-638.
- [34] Chalupa-Krebsdak, S., Long, C.J., Bohrer, B.M. (2018). Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. *International Dairy Journal*, 87, 84-92.

- [35] Abelilla, J.J., Liu, Y., Stein, H.H. (2018). Digestible indispensable amino acid score (DIAAS) and protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) in oat protein concentrate measured in 20- to 30-kilogram pigs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), 410-414.
- [36] Simopoulos, A.P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 128.
- [37] Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233, 6, 684-688.
- [38] Astolfi, M.L., Marconi, E., Protano, C., Canepari, S. (2020). Comparative elemental analysis of dairy milk and plant-based milk alternatives. *Food Control*, 116, 107327.
- [39] Gram, S. (2021). The effect of ultrasound and homogenization processes on the physicochemical properties of hemp milk. Master Thesis. Institute of Graduate Studies: Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey.
- [40] Huang, K., Zhang, S., Guan, X., Li, C., Li, S., Liu, Y., Shi, J. (2021). Effect of the oat  $\beta$ -glucan on the development of functional quinoa (*Chenopodium quinoa* wild) milk. *Food Chemistry*, 349, 129201.
- [41] Jeske, S., Zannini, E., Arendt, E.K. (2017). Evaluation of physicochemical and glycaemic properties of commercial plant-based milk substitutes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1), 26-33.
- [42] Lai, H., Wang, S., Nguyen, Z., Li, B. (2021). Process optimization and antioxidant activity changes of fermented hemp seed milk. *Modern Food Technology*, 37(07), 194-202.
- [43] Vaikma, H., Kaleda, A., Rosend, J., Rosensvald, S. (2021). Market mapping of plant-based milk alternatives by using sensory (RATA) and GC analysis. *Future Foods*, 4, 100049.
- [44] Farinon, B., Molinari, R., Costantini, L., Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. *Nutrients*, 12(7), 1935.
- [45] Silva, A.R.A., Silva, M.M.N., Ribeiro, B.D. (2020). Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International*, 131, 108972.
- [46] Szparaga, A., Tabor, S., Kocira, S., Czerwińska, E., Kuboń, M., Płóciennik, B., Findura, P. (2019). Survivability of probiotic bacteria in model systems of non-fermented and fermented coconut and hemp milks. *Sustainability*, 11(21), 6093.
- [47] Zhu, X., Wang, Z., Li, M., Wang, Y., Li, Z., Yang, H., Zhang, N., Sun, B. (2021). Effect of heat treatment on the stability of hemp seed milk and characterization of protein structure. *Food Science and Human Wellness*, 42(7), 68-73.
- [48] Bartkiene, E., Zokaityte, E., Lele, V., Sakiene, V., Zavistanaviciute, P., Klupsaite, D., Bendoraitiene, J., Navikaite-Snipaitiene, V., Ruzauskas, M. (2019). Technology and characterisation of whole hemp seed beverages prepared from ultrasonicated and fermented whole seed paste. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 406-19.
- 
-



## Dairy Products in Space Nutrition and Potential Processing of Dairy Products with 3D/4D Printers as a Space Food

Anıl Bodruk<sup>1,2</sup>  , Furkan Acar<sup>1</sup> <sup>1</sup>Pınar Dairy Products Inc., R&D Center, İzmir, Turkey<sup>2</sup>Ege University, Graduate School of Natural and Applied Science, Department of Food Engineering, İzmir, Turkey

Received (Geliş Tarihi): 26.03.2021, Accepted (Kabul Tarihi): 05.05.2022

✉ Corresponding author (Yazışmalardan Sorumlu Yazar): [anil.bodruk@pinarsut.com.tr](mailto:anil.bodruk@pinarsut.com.tr) (A. Bodruk)

☎ +90 0232 436 15 15/503 📠 +90 232 436 20 40

### ABSTRACT

Dairy products, which have been used for many years in the nutrition of individuals, have many benefits for human health. Due to recent developments such as climate changes, raw material deficiency and increased population, humankind has been forced to seek alternative resources from the space in the latest decades. Yet, in the space, feeding has for so long been world-centered and effectuated short term. Due to swift rise of 3-dimensional and 4-dimensional printer technologies at the end of 20th century, onset of 21st century, quick expansion, and wide use of such technologies, their use in space missions and space-food production has come to the surface. Within the context of this study, data related to utilizing dairy products as a space food and data on using 3-dimensional (3D) and 4-dimensional (4D) printers to generate these products in space mission were collected and evaluated in the review.

**Keywords:** Space Food, Dairy Products, 3D Printer, 4D Printer, Novel food processing

### Uzayda Beslenmede Süt Ürünleri ve 3D/4D Yazıcılarla Üretilecek Süt Ürünlerinin Uzay Gıdası Olarak Kullanım Olanakları

#### ÖZ

Bireylerin beslenmesinde çok uzun yıllar boyunca kullanılan süt ürünlerinin insan sağlığı açısından birçok faydası bulunmaktadır. İnsanlığın son yıllarda gerek iklim krizi, gerek hammadde yetersizliği gerekse de artan nüfus etkisi ile farklı kaynakları uzaydan arama çalışması hız kazanmıştır. Uzayda beslenme ise; uzun yıllar boyunca dünya kaynaklı ve kısa süreli olarak gerçekleştirilmiştir. 3 boyutlu ve 4 boyutlu yazıcı teknolojilerinin 20. yüzyılın sonu ve 21. yüzyılın başında ortaya çıkması ve hızlı bir şekilde yayılıp, geniş kullanım alanı bulması sebebiyle uzay görevlerinde ve uzay gıdaları üretiminde de kullanımı söz konusu olmuştur. Bu çalışma kapsamında, uzay gıdası olarak süt ürünlerinin değerlendirilmesi, 3 boyutlu (3D) ve 4 boyutlu (4D) yazıcıların bu ürünlerin uzay görevi sırasında üretilmesi için kullanılması konusunda bilgiler derlenmiş ve değerlendirmeler yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Uzay gıdası, Süt ürünleri, 3 boyutlu yazıcı, 4 boyutlu yazıcı, Yenilikçi gıda işleme

### INTRODUCTION

Throughout history one of the greatest wonders of humanity has been cosmos and sky objects. That is the exact point that researches of many civilizations focused on and in result of these researches, a good number of scientific discoveries have also blossomed. In 1957

launching of the first artificial satellite Sputnik by Russia became a major turning point for humanity and humanity thus began to explore the space by the tools it generated and gained novel insights from this exploration [1]. Since the start of 1960, significant developments have been achieved in space flight technologies. Such developments helped to extend the

time spent in the space from minutes to days first, then from months to years as can be seen in our age [2]. In the post 2nd World War, preparation of NASA for space mission and ground steps Soviet Union took in this attempt accelerated the researches about living and trading in space and as expected, humanity began to wonder if "life in space is possible". That perspective gave rise to develop varied foods for astronauts and cosmonauts on a long-term space mission. Since the 108-minute flight of Yuri Gagarin in 1961 they have been eating food in space. With the advent of 1961 both the USA and Russia conducted researches to develop safe, instantly-made, instantly-consumed, compact and packaged foods with minimum waste while also appealing and nutritious to be consumed in space. Humanity's products in their space adventure consist of foods that were already widely consumed by astronauts and cosmonauts and reflect traditional traces from their diet on earth [3]. Besides the most vital issue in that matter is to provide the ingredients that humans at space mission need and prepare foods by taking space conditions into account. Milk, by virtue of many ingredients in its composition, is a food type with high digestibility. At the same time it is a vital resource for the items that must be taken on a daily basis. Carbohydrate group corresponds to around 30% of the dry matter of milk and cow milk that refers to most of the drinking milk. Main carbohydrate of milk is a form of disaccharide; lactose. Milk fats contain specific fatty acids with saturated and unsaturated traits; furthermore it plays active role in dissolving some of the vitamins contained in milk. Building and repairing effect of milk proteins for nutrition and muscle growth (adequate ratios of essential amino acids) is also an emphasis on the value of milk in terms of essential nutrients [4, 5]. Fermented milk constitutes another group and can be categorized as a microorganism source with probiotic features. Hence milk and milk products provide great health benefits and offer substantial benefit in human nutrition [6]. In modern age, consumption habits shifted towards fast consumption and production periods shortened. In parallel with these objectives exponential transformations also took place in production stages. In that aspect, inclusion and integration of 3-dimensional printers to production process and inclusion of 4-dimensional printers to this process too in near history came to the surface. As a consequence of evolution of space mission into life in space, the possibility of producing in stages our traditional and popular foods - milk and dairy products- in space territory has been examined within the scope of this study.

### **SPACE ADVENTURE OF HUMANITY AND FOOD CONSUMPTION IN SPACE**

Space journey that first began as Russia launched to space Sputnik satellite and first living being to space [7] continues full speed in present age and it is envisaged that in the 21st century, a tiny colony will be set up in the planet and first steps to a new life will thus be taken. Initiated by Soviet Russia before the appearance of space programs led by the USA in 1961, space adventure of humanity has gained further impetus. First consumption of food, however, took place in 1961 in

space [8]. In space adventure USA alone managed to take huge steps at certain intervals and particularly with the initiatives of International Space Station (ISS) an extensive research process uniting researchers from entire world started. In the advancement of space researches early steps taken by Soviet Russia and modern Russian cosmonauts and researchers contributed immensely to building the process as it is now. It is witnessed that certain space programs in particular hold up a critical position in the space adventure of humankind. Within the context of this analysis, programs developed by NASA have been investigated. Chronological order of these programs is such; Mercury, Gemini, Apollo, Skylab, Space Shuttle and International Space Station. Mercury program took place from 1961 to 1963 and it was in this 34-hour journey when after Yuri Gagarin food consumption (1962) in the space happened at first [9,10]. Within this space adventure having these two diverse features together; products in liquid form and preserved in easily-opened tube packages. Gemini program: Within the scope of this space program with varied missions between 1965-1966, a food menu was used in space for the first time and HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) concept and practices that lay the ground for food safety in modern age was initiated. Apollo program took place between 1968-1972 with an aim to stay in space longer and in this program there were also researches on how to improve food quality and variety, Similar to Gemini program, foods in this program were inside simple and easy-to-open packages and could be consumed in dry, solid or liquid form to be heated in water or consumed in liquid form for the use of researchers [11]. Skylab program that took place between 1973-1974 was the space program containing the most comprehensive metabolic research till then and it is at the same time the program offering richest menu selection. As years passed, time spent in the space increased and dining turned into a serious activity; thus it was suggested to improve the presentations in food halls. It has been reported that in Skylab program, for the first time, freezer, heater units, sophisticated dining tables and cooking utensils for the astronauts were available. Space Shuttle program is a program that started in 1981 and continued even in the 2000s. Being a program with the greatest product selection, designs aiming to minimize waste were also presented within the context of this program. Additionally this is the first program in which all of the products chosen by astronauts were put on the menu that had reflected varied dietary choices. Russia became the partner country in a certain part of this program [12]. However, in essence, International Space Station is the most extensive and universal program. International Space Station program: It partially started with Space Shuttle program and in this program main goal is to spread globally the joint initiative with Russia and attain a truly international character and to make it easy to build a common future and solution for the humanity by integrating it to space researches from other countries [13, 14]. In line with this aim centers established in Europe, Japan and Canada now provide support to ongoing researches. In this active program, researches on the agricultural processes in space were also

initiated. In this program food systems and food diversity was truly left to the astronauts' preferences and cultural effects. Currently the same program evolved into a global program enlightening space wonder of humankind [10, 15].

### DIETARY NEEDS IN SPACE AND PLACE OF DAIRY PRODUCTS

The fact that space flights last long in many instances and there are longer stays in the space due to extended missions it is likely to witness different effects on humans. A grownup human being's basic daily needs under the conditions of earth differ from the ingredients required under space conditions. Space conditions may result in a myriad of physiological and psychological outcomes which can also affect their nutritional state. In the space nutrition plays vital role for both physical, psychological and overall health (immunity, musculoskeletal system) of humans [16]. Another variance related to dietary needs in space is the change in iron metabolism. Increased need for iron mineral in space environment could also give rise to hematological stages. A human being's iron need on earth is ~10 mg; in space however this ratio may escalate to the range of 15-18 mg though also dependent on the length of stay, gender and overall body form and some other factors [17]. In the same vein, elevated radiation and oxidative stress levels during flight could trigger diminished antioxidant levels during or after a space flight. Furthermore during this stage some of the other occurrences are decrease in blood cells, problems in physical movement, rise in dehydration and troubles in electrolyte/mineral balance [18]. Such lengthy space journeys can also have an effect on vitamin mineral need. Normally a human being's daily Calcium mineral (Ca) need is approximately 1000 mg whilst in space s/he required to consume around 20% more Ca because during these missions there is degradation in Ca absorption activity and a similar case also holds true for potassium intake. One of the biggest problems experimented after space flights is physical movement problems related to bone stability and it is attributed to a diet low in animal protein and potassium intake. This hypothesis also leads to claim that it could also be critical to preserve bone health also on Earth; that high protein intake could indirectly escalate body acidity whereas potassium mineral could, by bringing out the ingredients which would create basic effect indirectly, restore acid-base balance in human body [17]. One of the most salient problems experienced during space travels and during the time spent in space is bone loss and deterioration. Flexibility and weakness created on bones during the time spent in space cannot be cured only through Ca and vitamin D supplements. Yet adding the foods with higher ratios of Ca mineral and vitamin D to diet is reported to have lowering effects on bone loss and related ailments [19]. Endocrine system and gastrointestinal-immune system problems are also other frequent complaints related to space travels. In particular, systemic problems are more widely witnessed in space missions lasting 3 months and longer. Increasing probiotic and prebiotic ingredients in diet is one of the topics analyzed in this process. Although it

has been reported that taking probiotic and prebiotic ingredients could relatively be helpful for immune system, there is not any sound data detected in literature [20]. Despite that, it is reasonable to claim that from a holistic perspective Ca mineral in particular, vitamin D, vitamin K, vitamin C, Fe mineral and relevant minerals and vitamins combined with probiotic supplements that a normal grownup would require on a daily basis could similarly play a vital role in meeting the nutritional needs in space. By including a wide range of nutrients, milk has been on front stage since ancient times as a fulfilling and nourishing product. Although a great composition of milk is water, remaining dry matter is reported to include more than 100 ingredients. Since its fat contains substantial fatty acids, milk fat is a valuable component. In the most common drinking milk, cow milk, there is 3-4 (m/m)% of fat though changeable with respect to regions [21]. More to that, milk can be classified as one of the biggest sources of calcium mineral in nature and milk is also a great source to get vitamin D [22]. Both of these ingredients offer sound benefits for a better bone health and overall development, growth and regulatory activities. Further to that vitamin B12 that is only available in animal products and endowed with a great number of functional effects; vitamin A, other B group vitamins and various mineral resources are also naturally available in milk. Added to that, in terms of proteins that have gained commercial popularity lately and also nutritional deficiencies, milk once again offers a great resource. It has been attested that carbohydrate intake combined with a specific ratio of protein resource is critical in achieving optimal body-fat ratio and regulated blood pressure [23]. Besides it has been acknowledged in many researches that essential amino acids within milk protein are critical in nutrition and muscle growth and biological value of milk protein is among the highest proteins on Earth [24, 4]. Another asset of milk products in particular fermented ones that can be defined as functional is probiotics, which add great nutritional value to milk when consumed enough daily intake values. Probiotics can be defined as the microorganism group offering benefits for the host agent once taken into body [25]. Many of the microorganisms forming probiotics belong to lactic acid bacteria and *Lactobacillus* and *Bifidus* are some examples to such bacteria. It has been reported that these bacteria render regulatory effects on gastrointestinal region and promote immune system. A vast majority of such bacteria already exist in the natural fermentation of dairy products. Yoghurt, kefir and specific types of cheese can also be considered to have such features. Supporting vitamin production and storing, anti-viral effect, anti-mutagen effect are some of the assets attributed to probiotics. Integral to these foods, probiotics provide benefits directly on the intestines and indirectly on immune system [26]. Dairy products are vital for human nutrition. However, dairy products are also needs to be enriched with different functional ways for human necessities. It is hard to enrich in particular cheese type of foods easily. In modern age, production technologies are changing and 3D production of dairy products and enriching of them would be easier than present production technologies.

## EVALUATION OF DAIRY PRODUCTS IN SPACE FOOD PRODUCTION VIA 3D (3-DIMENSIONAL) AND 4D (4-DIMENSIONAL) PRINTERS

3-dimensional printer technologies seem to be a relatively novel technology but in reality, it stands before us as a technology with influences in the 20th century too. In relation to this technology, the very first application for patent belongs to Japanese Doctor Hideo Kodama in 1980 [27]. 3D printer technologies are a novel technology mainly having emerged in the field of material engineering, yet in modern age it became an attraction point for the products in many domains such as textile, food, health, electronics, automotive and fashion and by growing ever more, it turned into a technology inspiring both the academia and industry [28]. In 3-dimensional printers key principal of operation is forming basic configuration of the product to be applied by the assistance of a computer program through a specific modeling and performing printing stages by following critical process steps. The most critical and basic components of 3-dimensional printers are; sigma profiles (structure named as external skeleton), step motors (parts that facilitate movement of printer), nozzle (printer end to melt the filament), filament (material to be poured after melting) and hot bearing (the surface where the filament would be poured to form the desired material). Further to that, to achieve smooth operation of the system required stoppers, various mechanical and software parts are also available. Thus it is feasible to print the product if optimal dimensions and temperature are present and can be stopped if a problem occurs and reprogramming can be achieved [29, 30]. In addition to popular use of 3-dimensional printers, in almost all domains of life, there are ongoing technological researches that allow reuse of a material in different features and dimensions in the aftermath of its production in a single step. In the 1980s, advancement in three-dimensional (3D) printing technologies- also known as additive production or rapid prototyping- have brought with itself new developments too [31]. NASA is supporting a current project that is aimed to produce 3D foods for space missions. 3D food printing can be allowed nutrition enrichment and any shape of product with any ingredients and these products will be fresh that is very crucial for astronauts and their needs and requires [39]. Le Tohic et al. (2018) have been studied 3D cheese processing and its textural properties. In the study processed cheese were melted to prepare the base material to the printing process at 75°C. It was found that the hardness was less and meltability was higher for the printed cheese when it compared to commercial processed cheese [32]. Ross et al. (2021) were also obtained 3D printed cheese. In the study, different parameters (filling temperature, cheddar cheese ripening time etc.) effects on 3D printing were determined. Higher cheese pH values were found softer texture after printing and at higher temperatures (60°C) were also found softer and the texture was more resilient [40]. Another 3D printed dairy study was about high protein yoghurt production. 10% fat Greek type yoghurt was used and protein enrichment (7.5-12.5%) and using gelatine, WPI (whey protein isolate) effects on the physical and sensory

properties were determined. It was found that WPI and gelatin were significantly affected the printability and the rheology. 12% of WPI addition was found more resilient. Gelatine addition was provided stable shape to printed product [41]. Introduced for the first time in 2013, there are current researches conducted in different domains on 4-dimensional printers. Dairy-product category represents a group with wide assortment and content of products and ingredients in dairy products and components with different characters related to such products can exhibit the feature of raw-material in 3-dimensional food production. To ensure that dairy products can be generated via 3-dimensional printers, it is of utmost importance to characterize these product formations quite well. At this stage, by identifying different formulations and providing best characterizations, it is essential to produce optimized products [32]. Production of dairy products with intense texture like yoghurt and cheese and based on this key principle under normal conditions, with different inputs that are particularly limited in cheese production. it appears to feasible to process-orientation and enriching stages via 3-dimensional (3D) printers. Producing of dairy products in 3-dimensional printers, it is important that present formulation be transferred to the system via nozzle under appropriate heat and viscosity. Heat is responsible from reactions such as Maillard that is expected in the final form of protein denaturation and product; thus it is vital to arrange heat in 3D production. Likewise, as for viscosity criteria, it can give insights about final product format and reticular structure to be formed by the proteins [33]. From that viewpoint, in the process of manufacturing dairy products by 3D printers building a widely comprehensive model that integrates such criteria as well as major parameters like microbiology and oxidation level are substantial for final product. While manufacturing industry is yet working on new applications, new materials and new 3-dimensional printers; Skylar Tibbits teaching at MIT (Massachusetts Institute of Technology) used for the first time “four-dimensional (4D) printing” term in his 2013 dated TED talk. It can allow static 3D printing objects to change their forms in time and thus introducing 4D printing/printer technologies [34]. The first paper on this topic was written before the end of same year. In this paper key objectives of 4-dimensional software were mentioned. In an age when 4-dimensional printing technologies were first mentioned, there was a description as 3D printing + time. In here it was stated that time was the fourth dimension but for the last few years, there has been another description joined with this one. The fact that form, feature and functionality of a 3D printing structure could change in time when exposed to a predetermined external stimulus such as heat, water, light, pressure, pH, sound etc. it became one of the most comprehensive definitions of 4-dimensional printers to present date [31]. The said situation is indeed related to building smart materials [35], key mechanism definitions for 4-dimensional printers are categorized below 5 different headings such as:

- 3-dimensional printing technologies:
- External stimulus
- Smart materials

- Interaction mechanism
- Mathematical model

To perform 4-dimensional software there is need for a material that would, under different operational conditions, undergo physical change leading to transformation in geometry and functionality. It is a must that relevant material would undergo change after being stimulated by a predefined external stimulus (heat, pressure, pH, light, UV etc.) so that this change would be performed by predefined stimulus parameters. This condition is essential to ensure that external stimulus feature and the material would take place within the framework of a specific mathematical expression [36]. To that end operation to take place (such as geometrical change under heat) must be defined in a mathematical model so that printer and material can provide proper function against the said external stimulus in that way. At the same time it is necessary to detect in what way and form the stimulus could be effective. This definition is known as effect mechanism of external stimulus. In defining all of them, to assure that the material would be produced in optimal forms and meet the desired conditions it is necessary that production be made by generating the best fitting 3-dimensional design [35]. Within that scope the most salient factor to consider is that if materials are appropriate for 4-dimensional (4D) printing, then, they are named as smart materials. Smart material concept refers to the kind of materials undergoing mostly physical, formal and occasionally physiochemical changes by reacting to the effects of an external stimulus. Although they undergo change as an effect of external stimulus (heat, pressure, light, pH, UV etc.) the main form of these materials is stored in their early memory. Yet these materials' shape memory effect and features defined as superelastic are critical for 4D software. Materials that have shape memory are listed below 5 main groups and these material groups includes materials with shape memory and performs alloy, ceramic, polymer, hybrid and gel features [37]. Although currently there are not any materials defined as to have smart features, it is estimated that in near future there will be a potential to manufacture food materials or food packages via 4-dimensional printers. At this stage it is suggested to emphasize particularly the value of shape memory polymer groups for the future. Shape memory polymers are elastic polymeric reticular structures composed of fixed points where there is molecular level cross linking with transition points that gain macroscopic shape by interconnecting these points. In these products fixed points allow to recall chemical or physical linking in the structure and entropic features of the polymer segments between them and its permanent shape. After ensuring that polymer structure gains permanent form, the order of processes is heating, deformation and cooling to give the product its temporary form [31, 38]. In order to produce relevant materials it is sufficient to have certain filament and basic raw materials and it appears that by following optimal modeling studies, it can be feasible to produce package materials with desired features and manage waste reduction as required. It has been agreed that in space 3-dimensional printers can be advantageous in developing different kinds of products and despite applications in a

limited area with fewer number of materials, it is still viable to obtain a variety of products. Added to that in order to minimize the size of product packages it seems appropriate to make use of 4-dimensional printers (4D) in their design. By using limited place and energy with same-ingredient materials it is feasible to provide food for the astronauts/cosmonauts and residents in space setting and also to produce foods particularly cheese, yoghurt and similar dairy products. Hence it will be possible to produce the kind of processes with high nutritional value in lower cost and energy but also demanding higher costs and energy in a setting under harsh conditions such as space so that there will be a chance to shape the future of humanity.

## CONCLUSION

It is an acknowledged fact that humanity has long been curious about space and has a past in which their future life was based on observing the sky. In near past there has been a great effort to satisfy their sky curiosity, establish life in sky and conduct trade operations as well. In the 2000s, steps were taken to meet humanity with this aim and agricultural operations already took place in space [13]. Researchers aiming to build a new life in the new age not only want to adapt their life on earth to their new habitat but also seek to keep their diet almost the same. Nevertheless considering the effects of space on human lives the fact that milk and dairy products also play a vital role becomes evident. Since it is infeasible to send tons of liters of milk from earth, it is more reasonable to consume products such as milk powder that is easy to transfer and store, and can be changed into milk form when needed. If combined with different technologies products such as cheese and yoghurt we consume on earth could also be offered in space for human consumption. As 3-dimensional printers can be used in product manufacturing and 4-dimensional printers in product packaging it will be possible to consume traditional earth foods in space and also to produce the kind of foods integrating ingredients essential in space could be procured in a practical way.

## REFERENCES

- [1] Bal, A. (2014). Hava-uzay araçlarının (aerospacecraft) hukuki rejimi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Hukuk Fakültesi Dergisi*, 15, 1465-1528.
- [2] Özçivici, E. (2013). Effects of spaceflight on cells of bone marrow origin. *Turkish Journal of Hematology*, 30, 1-7.
- [3] Deveci, B., Deveci, B. (2018). Uzayda beslenme ve gelişim süreci üzerine teorik bir değerlendirme. *Journal of Tourism and Gastronomy Studies*, 6(3), 26-38.
- [4] Miller, G.D., Jarvis, K.J., McBean, L.D. (2000). Handbook of dairy foods and nutrition. CRC Press, New York, NY, 2000.
- [5] Ergin, G. (1976). Süt, beslenme ve sağlık. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7(1), 175-190.
- [6] Demirgöl, F., Sağdıç, O. (2018). Fermente süt ürünlerinin insan sağlığına etkisi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 13, 45-53.

- [7] Anonymous a. (2020). Space race timeline. <https://www.rmg.co.uk/discover/explore/space-race-timeline>, Access: 26 October 2020.
- [8] Aydın, C. (1991). Uzay araştırmaları önemi ve ülkelerin gelişimine katkısı. *Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 67-71.
- [9] Dick, S.J. (2010). NASA's first 50 years: historical perspectives. National Aeronautics and Space Administration,-Office of Communications, History Division, Washington.
- [10] Perchonok, M., Bourland, C. (2002). NASA food systems: past, present, and future. *Nutrition*, 18(10), 913-920.
- [11] Smith, Jr.M.C., Huber, C.S., Heidelbaugh, N.D. (1971). Apollo 14 food system. *Aerospace Medicine*, 42(11), 1185-1192.
- [12] Bourland, C.T. Fohey, M.F., Rapp, R. M., Sauer, R.L. (1982). Space shuttle food package development. *Food Technology*, 36(9), 38-43.
- [13] NASA. (2020). Growing plants in space. <https://www.nasa.gov/content/growing-plants-in-space>, Access: 19 October 2020.
- [14] Smith, S.M., Davis-Street, J.E., Rice, B.L., Nillen, J.L., Gillman, P.L., Block, G. (2001). Nutritional status assessment in semiclosed environments: ground-based and space flight studies in humans. *The Journal of Nutrition*, 131(7), 2053-206.
- [15] NASA. (1996). Nutritional requirements for international space station missions up to 360 days, 28038. NASA Johnson Space Center, Houston, TX.
- [16] Oluwafemi, F.A., De La Torre, A., Afolayan, E.M., Olalekan-Ajayi, B.M., Dhital, B., Mora-Almanza, J.G., Potrivitu, G., Creech, J., Rivolta, A. (2018). Space food and nutrition in a long term manned mission. *Advances in Astronautics Science and Technology*, 1(1), 1-21.
- [17] Smith, S.M., Heer, M.A., Shackelford, L.C., Sibonga, J.D., Ploutz-Snyder, L., Zwart, S.R. (2012). Benefits for bone from resistance exercise and nutrition in long-duration spaceflight: evidence from biochemistry and densitometry. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(9), 1896-1906.
- [18] Smith, S.M., Zwart, S.R., Block, G., Rice, B.L., Street, J.E.D. (2005). The nutritional status of astronauts is altered after long-term space flight aboard the International Space Station. *American Society for Nutritional Sciences The Journal of Nutrition*, 135(3), 437-443. 2005.
- [19] Whedon, G.D., Rambaut, P.C. (2006). Effects of long-duration space flight on calcium metabolism: Review of human studies from Skylab to the present. *Acta Astronautica*, 58(2), 59-81.
- [20] Enrico, C. 2(016). Space nutrition: the key role of nutrition in human space flight. ArXiv preprint, arXiv 1610.00703. Cornell University, NY.
- [21] Fox, P.F., McSweeney, P.L. (2007). Advanced dairy chemistry volume 2: lipids, Springer Science & Business Media, New York, NY.
- [22] Metin, M. (2005). Süt teknolojisi sütün bileşimi ve işlenmesi. EÜ Mühendislik Fakültesi Yayınları. Bornova, İzmir.
- [23] Varnam, A., Sutherland, J.P., 2001. Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology, Springer Science & Business Media, Gaithersburg MD.
- [24] Ünal, R.N., Besler, H.T. (2008). Beslenmede sütün önemi. Sağlık Bakanlığı Yayınları, 40.
- [25] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) (2002). "Guidelines for the evaluation of probiotics in food". <http://ftp.fao.org/es/esn/>, Access: 18 December. 2020.
- [26] Sezen, A., Koçak, C. (2006). Fonksiyonel süt ürünleri teknolojisindeki gelişmeler. 9. Türkiye Gıda Kongresi. 24-26 Mayıs Bolu.
- [27] Anonymus b. (2020). 3D yazıcı tarihi ve çeşitleri. <https://www.3dyaziciturkiye.com/post/3d-yaz%C4%B1c%C4%B1-tarihi-ve-%C3%A7e%C5%9Ffitleri>. Access: 30 November 2020.
- [28] Değerli, C. (2020). Processed meat production in 3 dimensional (3D) printing technology. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(5). 1018-1026.
- [29] Anonymous c., 2020. 3D yazıcı parçaları tam liste. <https://rasyonalist.org/yazi/3d-yazici-parcalari-malzemeleri-elemanlari/>, Access: 3 December 2020.
- [30] Anonymous. (2017). 3D systems-sense scanner. <https://www.3dsystems.com/3d-scanners/sensescanner>, Access: 4 December 2020.
- [31] Ege, G.K., Sürmen, H.K., Bektaş, B., Akkuş, N. (2019). 4D baskı teknolojisi ve biyobaskı alanındaki uygulamaları, *4th International Congress On 3d Printing (Additive Manufacturing) Technologies and Digital Industry*. Antalya.
- [32] Le Tohic, C., O'Sullivan, J.J., Drapala, K.P., Chartrin, V., Chan, T., Morrison, A.P., Kelly, A.L. (2018). Effect of 3D printing on the structure and textural properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering*, 220, 56-64.
- [33] Ross, M.M., Kelly, A.L., Crowley. S.V. (2019). Potential applications of dairy products, ingredients and formulations in 3D printing. In *Fundamentals of 3D Food Printing and Applications*. Academic Press, London.
- [34] Tibbits, S. (2014). 4D printing: multi-material shape change. *Architectural Design*, 84(1), 116-121.
- [35] Momeni, F., Liu, X., Ni, J. (2017). A review of 4D printing. *Materials & Design*, 122, 42-79.
- [36] Huang, W.M., Ding, Z., Wang, C.C., Wei, J., Zhao, Y., Purnawali, H. (2010). Shape memory materials. *Materials Today*, 13(7-8). 54-6.
- [37] Sun, L., Huang, W.M., Ding, Z., Zhao, Y., Wang, C.C., Purnawali, H., Tang, C. (2012). Stimulus-responsive shape memory materials: a review. *Materials & Design*, 33, 577-640.
- [38] Memiş, N.K. Kaplan, S. (2018). Şekil hafızalı polimerler ve tekstil uygulamaları. *Tekstil ve Mühendis*, 25(111). 264-283.
- [39] Leach, N., 2014. 3D printing in space. *Architectural Design*, 84(6), 108-113.
- [40] Ross, M.M., Crowley, S.V., Crotty, S., Oliveira, J., Morrison, A.P., Kelly, A.L. (2021). Parameters affecting the printability of 3D-printed processed



cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72, 102730.

[41] Riantiningtyas, R.R., Sager, V.F., Chow, C.Y., Thybo, C.D., Bredie, W.L., Ahrné, L. (2021). 3D

printing of a high protein yoghurt-based gel: Effect of protein enrichment and gelatine on physical and sensory properties. *Food Research International*, 147, 110517.

---

## Sürdürülebilir Beslenme ve Protein İhtiyacı İçin Alternatif Bir Kaynak: Sentetik Et (Kültür Eti)

Mücahit Muslu  

İstanbul Arel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul

Geliş Tarihi (Received): 09.05.2021, Kabul Tarihi (Accepted): 12.04.2022

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [dytmuslu@gmail.com](mailto:dytmuslu@gmail.com) (M. Muslu)

☎ 0 850 850 27 35 📠 0 212 860 04 81

### ÖZ

Dünya genelinde artan nüfusla beraber beslenme yetersizlikleri de artmaktadır. Beslenme yetersizlikleri hastalıklar ve ölümlerin önemli nedenlerindedir. Sentetik et açlığın önlenmesi ve sürdürülebilir beslenme için geleceğe yönelik gıda kaynakları arasında gösterilmektedir. Sentetik et laboratuvar ortamında ileri teknoloji ile hayvanlardan alınan dokuların çoğaltılmasına dayanır. Bu sayede hayvancılık sektörünün çevreye vermiş olduğu zararların ve hayvanların kesilmesinden doğan etik sorunların azalacağı düşünülmektedir. Sentetik et teknolojisi gelişmekle beraber birçok konu tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Et üretim aşamasında istenen lezzet, doku ve görünüme sahip etler tam olarak üretilmemiştir. Üretilen etler ise çok pahalı olmaktadır. Aynı zamanda çeşitli sosyokültürel nedenlerle bu etin toplumlar tarafından kabulü konusunda sıkıntılar bulunmaktadır. Sentetik et konusunun net anlaşılabilmesi için bu alanda çalışmaların artırılıp, mevzuat ve politikaların geliştirilmesi gerekmektedir. Bu derleme sentetik et konusunda güncel bilgilerle en son durumu ortaya koymayı amaçlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Sentetik et, Kültür eti, Sürdürülebilir beslenme

### An Alternative Source for Sustainable Nutrition and Protein Needs: Synthetic Meat (Cultured Meat)

#### ABSTRACT

Nutritional deficiencies increase with an increase in population worldwide. They are important causes of diseases and deaths. Synthetic meat is among the future food sources for hunger prevention and sustainable nutrition. Synthetic meat is based on the reproduction of tissues from animals with advanced technology in a laboratory environment. In this way, it is thought that damages caused by the livestock sector to the environment and ethical problems resulting from slaughtering could be reduced. Although synthetic meat technology has improved, many issues have not been fully solved yet. Moreover, production of synthetic meats with desired flavor, texture and appearance have not been fully achieved. Producing this type of meats is very expensive. There are also other problems with the acceptance of this meat by communities for various sociocultural reasons. In order to understand the synthetic meat issue clearly, studies in this field should be increased and legislation and policies should be developed. This review aims to present the latest situation with updated information about synthetic meat.

**Keywords:** Synthetic meat, Cultured meat, Sustainable nutrition



## GİRİŞ

Dünya genelinde önemli sağlık sorunlarından biri enerji ve protein yetersizliğine bağlı olarak gelişen malnutrisyondur. Beslenme yetersizliğine bağlı olarak gelişen hastalıklar özellikle anne ve çocuk ölümleri başta olmak üzere sekonder hastalıklar ve iş gücü kaybı gibi önemli sorunlara neden olmaktadır. Günümüzde dünya nüfusu 7 milyarın üzerindedir ve her 9 kişiden biri açlık çekmektedir. Tahminlere göre 2050 yılında dünya nüfusu 9.7 milyara ulaşacaktır. Bu nedenle dünya nüfusunu besleyebilmek ve hastalıkları önlemek için alternatif gıda kaynakları araştırılmaktadır [1, 2]. 2050'de büyüyen nüfusun talebini karşılamak için %70 daha fazla gıdaya ihtiyaç olacağı tahmin edilmektedir. Kaynak ve ekilebilir arazi sınırlamaları nedeniyle büyük zorlukların ortaya çıkması beklenmektedir. Gelişmiş ülkelerde et tüketimi azalsa bile, özellikle Çin, Hindistan ve Rusya gibi gelişmekte olan ülkelerde tüketim arttığı için küresel tüketim artmaktadır [3].

Sentetik et, doku mühendisliği teknolojisine sahip laboratuvarlarda *in vitro* olarak üretilen et anlamına gelmektedir. Hayvanlardan alınan bir miktar dokunun bu ortamda çoğaltılarak et elde edilmesine dayanmaktadır [4, 5]. Sentetik etin; et tüketimi ve pazarlanması süresince ortaya çıkan hayvan hakları sorunu, ekonomik sorunlar, kaynak kıtlığı, çevre sorunları ve halk sağlığı gibi birçok konuda çözüm oluşturabileceği düşünülmektedir [5]. Sentetik et üretiminin geleneksel üretime karşı bir alternatif olabileceği fikri ilk olarak Frederick Edwin Smith ve Winston Churchill tarafından 1930'larda ortaya atılmıştır [6]. 1943'te bir bilim kurgu yazarı Ravage adlı romanında sentetik etin restoranlarda kullanılmasını işlemiştir [7]. 1999'da Hollanda'dan gelen Willem van Eelen, et kültürü tekniğini kullanarak et işleme kavramı için uluslararası ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) düzeyinde patenti alan ve uygulayan ilk bilim insanı olmuştur [8]. Laboratuvar ortamında incelenmesi ve üretim amacıyla çalışmaların başlaması ise Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (NASA) tarafından uzay uçuşlarında sürdürülebilir bir besin tedarik sisteminin oluşturulması amacıyla desteklenen Benjaminson ve ark. [9] tarafından petri kabında bir balığın (*Carassius auratus*) kas dokularının üretilmesiyle başlamıştır. *In vitro* ortamda ilk burger köfte üretimi farmakolog Dr. Mark Post tarafından 2013 yılında gerçekleştirilmiştir. Üretilen bu etin geleneksel ete benzemesiyle insanların tüketilebilir etleri laboratuvar ortamında üretebileceği fikri güç kazanmıştır [10, 11]. Üretilen bu etin yaklaşık 142 gramı (5 ons) 330.000 dolara üretilmiş ve üretimi yaklaşık 3 ay sürmüştür. Üretim uzun sürmesi ve yüksek maliyetli olması nedeniyle ticari olarak tüketimi uygun görülmemiştir [12, 13]. Üretilen bu et kırmızı yerine sarımsı renktedir ve tadı eti andıran düzeydedir. Görünüşünü bir sığır eti gibi göstermek için kırmızı pancar suyu ve safran eklenmiştir. Eti ilk deneyen kişiler etin tat ve kıvamının gerçek ete benzediğini belirtmiştir [14]. Artan ilgi ile sentetik et araştırmaları devam etmiş ve gelişmiştir. Son dönemlerde sentetik et araştırma tarihi incelenmiş ve bir bibliyometrik çalışma yayınlanmıştır [15, 16].

## SENTETİK ETİN ÜRETİMİ

Sentetik et canlı hayvanlardan biyopsi ile alınan kök hücrelerini yağ ve kas hücrelerine dönüşmesine dayanan bir teknoloji ile üretilmektedir [11]. Alınan kök hücre tipi, kültür kaynağı ve kültür ortamına göre üç farklı açıdan değerlendirilmektedir. Seçilen kök hücreler sınırsız üreme potansiyeli olan embriyonik kök hücreler veya yetişkin kök hücreler olmaktadır. Embriyonik kök hücreler çeşitli sinyallerle uyarılarak farklı dokularda büyür ve farklı dokulara dönüşebilir. Embriyonik kök hücre kullanımı hayvan embriyolarından alınmaları nedeniyle etik sorunlara neden olmaktadır. Yetişkinlerden alınan myosatellit hücreleri ise kas dokusunda büyümek ve dönüşmek için sinyallere ihtiyaç duymazlar ama hayvanlardan izolasyonları zordur ve biyopsi gerektirmektedir. Ayrıca uzun süre bölünmeleri nedeniyle Hayflick limiti denen telomerlerin kısalmasına bağlı bölünme özelliklerini kaybetme görülür [15]. Alınan bu kök hücreler besin, hormon ve büyüme faktörleri sağlanarak kültür ortamlarında çoğaltılmaktadır. Bu etmenlerin sağlanması için ölü buzağı kanından elde edilen fetal sığır serumu (FSS) kullanılmaktadır. Büyüyen hücreler 0.3 mm'den daha uzun olmayan miyotüpler oluşturmak üzere birleştirilir. Daha sonra miyotüpler, küçük bir kas dokusu parçası halinde büyüyen bir halkaya yerleştirilir. Burada bir trilyondan fazla lif oluşturulabilir. Oluşan liflerin, besin maddeleri ile dolduran ve mekanik olarak geren bir iskelet üzerine bağlanarak gelişmeleri sağlanır. Bu üretim prosedürü hayvanların kullanılmamasına dayanan vaatler konusunda sıkıntı yaratmaktadır. FSS kullanımı vegan ilkelerle çelişmektedir [17, 18]. Bununla birlikte üretilen et, organize liflerden, kan damarlarından, sinirlerden, bağ dokusundan ve yağ hücrelerinden oluşan gerçek kasa hala tam anlamıyla benzememektedir [19]. Etin duyu kalitesi (lezzet, tat, görüntü), türler arasında (sığır, tavuk, koyun) ve tür içinde (genç, yaşlı), cinsler, cinsiyetler, beslenme koşulları ve esas olarak farklı anatomik konuma sahip kas türleri arasında farklılık göstermektedir. Şuan için sentetik et geleneksel etin istenen özelliklerini sağlayamamaktadır [20].

## SENTETİK ETEN BEKLENEN FAYDALAR

Hayvan hakları konusu son dönemlerde özellikle gelişmiş ülkelerde büyük bir eleştiri konusu haline gelmiştir. Bu konu ile ilgili birçok vegan kuruluş ve aktivist çeşitli faaliyetler yürütmekte ve yazılar yazmaktadır [11]. Bu nedenle sentetik et bazı aktivistler tarafından desteklenirken bazıları tarafından üretim sürecinde kullanılan hayvan embriyo veya serumları nedeniyle eleştirilmektedir. Buna rağmen laboratuvarlarda sentetik et üretiminin artmasıyla hayvanların öldürülmesinin önüne geçeceği beklenmektedir. Böylece özellikle hayvan hakları ihalleri ile ilgili birçok sorunun çözülebileceği düşünülmektedir [7, 21].

Geleneksel et üretimi için hayvancılık sistemleri hayvan hastalıkları, salgın hastalıklar ve antibiyotiklerin yanlış kullanımı riskini beraberinde getirmektedir [22]. Geleneksel koşullarda üretilen etlerde hayvansal bulaş kaynaklı *E. coli*, *Salmonella* ve *Campylobacter* gibi her

yıl milyonlarca mikroorganizma üreyebilmektedir [23]. İşlenmiş et üretimi sırasında %0.08 ile %0.25 arasında sodyum benzoat kullanımı ile etlerde mikrobiyal risk azaltılmaktadır [24]. Sentetik etler ise laboratuvar koşullarında her aşaması ileri teknoloji ile analiz edilerek üretilmektedir. Üretilen etin lezzet, koku, renk, içerik gibi kalitesini belirleyen özellikleri en üst seviyede tutulmaya çalışılmaktadır [21].

Geleneksel hayvancılıkta, hayvanların yenilebilir et oranı değişmekle birlikte özellikle büyükbaş hayvanlarda %50'nin altındadır. Bu durum geleneksel et üretimi için düşük bir dönüşüm oranı sağlamaktadır [21, 25]. Sera gazı emisyonlarının oluşmasının, arazi kullanımının, su ve enerji tüketiminin önemli bir kısmı ile ilgili sorunlar hayvancılık kaynaklıdır [26, 27]. Avrupa Birliği tarafından yapılan çalışmalarla, sığır ve tavuk gibi çiftlik hayvanlarının yetiştirilmesinin çevre kirliliğine yol açtığı bilinmektedir. Örneğin oluşan sera gazının %9.1'i ve arazi kullanımının %12.8'i hayvancılık sektörüne aittir [28]. Bu istatistiklere dayanarak, sentetik et Avrupa genelinde pazara yaygın bir şekilde nüfuz etmeyi başarırorsa, sera gazı, arazi kullanımı ve suyun kirlilik oranını sırasıyla %78-96, %99 ve %82-96 oranında azaltması beklenmektedir [29, 30].

## SENTETİK ET İLE İLGİLİ SORUNLAR

Sentetik et ile ilgili sorunlar genel olarak maliyet ve kaynak gibi teknik sorunlar, etin tüketilebilirliğini etkileyen kalite sorunları ve etin kabulünü etkileyen sosyokültürel sorunlardan oluşmaktadır [7, 31]. Sentetik et üretimi sürecinde hala tam olarak geleneksel et özelliklerini taşıyan et üretilememiştir. Lezzet, tat, koku gibi kalite ile ilgili problemler hala sürmektedir. Üretilen etler çok uzun sürede yüksek maliyetle üretildiği için şuan geleneksel etin yerini alacağı düşünülmektedir [32]. Bazı kesimler ise protein kaynağı olarak bitkisel protein üretim teknolojilerinin ilerlediğini ve tercih olarak bu kaynakların seçilmesi gerektiğini savunmaktadır. Bu nedenle sentetik et üretimini desteklememektedir [33]. Sentetik et açısından tartışılan farklı bir konu da gerçekten et statüsünde değerlendirilip değerlendirilmeyeceğidir. Bu konuda bazı kesimler tarafından sahte et olarak damgalanmaktadır. Bu da tüketici algısı açısından olumsuz sonuçlar doğurmaktadır [34]. Yapılan bir çalışmada tüketicilerin doğal olmayan terimleri ile anıldığında ürünleri tüketmek istemedikleri bildirilmiştir. Bu nedenle sentetik et konusunda uygun bir isimlendirmenin yapılması gerekmektedir [35].

Geleneksel hayvancılık yöntemlerinde hayvanların beslenmesi düzenlenerek elde edilen etlerin bazı besin ögesi içerikleri artırılabilir. Özellikle et tüketimi sırasında sağlık problemleri nedeniyle yağ asitleri tartışılmaktadır. Gelişen yem teknolojisi ile bu sorunlara çözümler getirilmektedir. Sentetik et üretiminde istenen besin öğelerinin sağlanması konusu tam olarak aydınlatılamamıştır. Fazla miktarda eklenecek mineral veya farklı öğeler sentetik eti kimyasal bir besin haline dönüştürebilir [15, 36]. Sentetik et üretiminde hücrelerin çoğalması sağlanırken tüm kontrol üreticilerin elinde olmayabilir. Etin üretimi sırasında kontrol koşulları iyi

sağlanmadığında kanser hücreleri gibi yapıların oluşma ihtimali bulunmaktadır. Bu ihtimal sağlık konusunda sıkıntı yaratabilmektedir [19].

Geleneksel et üreticiliği özellikle çiftçileri kapsayan birçok insanın çalıştığı bir sektördür. Hayvancılık et, süt, yumurta gibi hayvansal besin kaynakları yanında yün, lif ve deri gibi farklı endüstriyel ürünleri de sağlamaktadır. Hayvancılık sektörü kırsal kesimin kalkınmasının yanında birçok endüstriye ham madde sağlamaktadır. Hayvan eti üretimi laboratuvarlarda gerçekleşirse bu alanda ekonomik problemler doğması beklenmektedir [37]. Bir diğer konu özellikle İslam ve Yahudi topluluklarında tüketimi etkileyecek din temelli helal veya koşer sorunudur. Hamdan ve ark. [15] yaptığı bir çalışmada sentetik etin İslam hukuku açısından değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu derlemede üretilen etin helal kabul edilebilmesi için etin kültür ortamı ve seçilen hücrelerin tanımlanması gerekliliği vurgulanmıştır. Helal bir et kültürünü kök hücre İslami usullere göre kesilmiş bir hayvandan alındığı ve işlem sırasında kan ve serumun kullanılmadığı kültür olarak belirtmiştir.

## SENTETİK ET ve BEKLENTİLER

Dünya genelinde artan protein ihtiyacını karşılamak için çeşitli alternatif yollar aranmaktadır. Sentetik et üretimi bu alternatifler arasında gözükmektedir. Bununla birlikte daha birçok konuda aydınlatılamamış yönleri bulunmaktadır. Bu nedenle bu alanda çeşitli pazar araştırmalarının yapılması, tüketici profillerinin belirlenmesi, üretim süreçleri ile ilgili mevzuatların belirlenmesi ve politikaların geliştirilmesi gerekmektedir [13]. Sentetik et ile ilgili ABD ve Avrupa Birliği içinde yapılan kısa mevzuat çalışmaları vardır ancak genel bir çalışma bulunmamaktadır [13, 38]. Sentetik et üretimi konusunda çalışan bazı bilim insanları ve kuruluşlar sentetik et teknolojilerinin geliştiğini ve yakın zamanda genelin tüketebileceği ekonomik koşullarla pazarlanabileceğini belirtmektedir. Artan protein ihtiyacının karşılanması yönünde desteklenmesi ve geliştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Özellikle vejetaryenler için iyi bir kaynak olacağı savunulmaktadır [15]. İtalya'da yapılan bir çalışmada 525 katılımcının %54'ü sentetik eti denemek istediğini belirtmiştir. Aynı zamanda sentetik et tüketicilerini et tüketmeyi azaltmaya çalışan, yüksek eğitilmiş ve genç ifadeleri ile tanımlanmışlardır [39]. Çin, Hindistan ve ABD'yi kapsayan farklı bir çalışmada ise %64,6'sının denemek istediği, %49,1'i düzenli olarak satın almak ve geleneksel et yerine yemek istediklerini belirtmiştir. Bu çalışmalar ileride sentetik et tüketiminin toplumlar tarafından kabullenebileceğini belirtmektedir [40].

## SONUÇ

Sentetik et hayvan ölümlerini azaltabilmesi, çevresel zararlarının az olması ve mikrobiyolojik koruma sağlanması gibi nedenlerle geleceğe yönelik protein alternatifleri arasında görünmektedir. Bununla birlikte etin laboratuvar koşullarında üretimi ile ilgili birçok konu tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca hayvan serum ve embriolarının kullanımı etik ve dini nedenlerle eleştirilmektedir. Yüksek maliyet, verimlilik sorunu,

toplum tarafından kabul edilebilirlik düzeyi ve etik problemlerin çözüme ulaşması gerekmektedir. Bu nedenle sentetik et ile ilgili bilimsel yayınların artması, pazar araştırmalarının gelişmesi, mevzuatların çıkarılması ve global politikaların oluşturulması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO. (2017). The state of food security and nutrition in the world 2017. Building resilience for peace and food security, FAO, Rome.
- [2] United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2019). World Population Prospects 2019: Highlights (ST/ESA/SER.A/423), New York.
- [3] Tobler, C., Visschers, V.H., Siegrist, M. (2011). Eating green. Consumers' willingness to adopt ecological food consumption behaviors. *Appetite*, 57(3), 674-682.
- [4] Tiberius, V., Borning, J., Seeler, S. (2019). Setting the table for meat consumers: an international Delphi study on in vitro meat. *NPJ Science of Food*, 3(1), 1-6.
- [5] Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F. (2017). In vitro meat: A future animal-free harvest. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(4), 782-789.
- [6] Arshad, M.S., Javed, M., Sohaib, M., Saeed, F., Imran, A., Amjad, Z. (2017). Tissue engineering approaches to develop cultured meat from cells: a mini review. *Cogent Food and Agriculture*, 3(1), 1320814.
- [7] Bhat, Z.F., Kumar, S., Fayaz, H. (2015). In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2), 241-248.
- [8] Schneider, Z. (2013). In vitro meat: Space travel, cannibalism, and federal regulation. *Houston Law Review*, 50, 991.
- [9] Benjaminson, M.A., Gilchrist, J.A., Lorenz, M. (2002). In vitro edible muscle protein production system (MPPS): Stage 1, fish. *Acta Astronautica*, 51(12), 879-889.
- [10] O'Riordan, K., Fotopoulou, A., Stephens, N. (2017). The first bite: Imaginaries, promotional publics and the laboratory grown burger. *Public Understanding of Science*, 26(2), 148-163.
- [11] Post, M.J. (2014). Cultured beef: medical technology to produce food. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1039-1041.
- [12] Post, M.J. (2012). Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Science*, 92(3), 297-301.
- [13] Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A., Sexton, A. (2018). Bringing cultured meat to market: technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 155-166.
- [14] Ghosh, P. (2013). World's first lab-grown burger is eaten in London. BBC News, Available at: [www.bbc.com/news/scienceenvironment-23576143](http://www.bbc.com/news/scienceenvironment-23576143) (Accessed: 08 April 2020).
- [15] Hamdan, M.N., Post, M.J., Ramli, M.A., Mustafa, A.R. (2018). Cultured meat in Islamic perspective. *Journal of Religion and Health*, 57(6), 2193-2206.
- [16] Fernandes, A.M., Fantinel, A.L., de Souza, A.R.L., Révillion, J.P.P. (2019). Trends in cultured meat. *Brazilian Journal of Information Science: Research Trends*, 13(3), 56-67.
- [17] Ben-Arye, T., Levenberg, S. (2019). Tissue engineering for clean meat production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 46.
- [18] Bhat, Z.F., Bhat, H., Pathak, V. (2014). Prospects for in vitro cultured meat—a future harvest. In *Principles of Tissue Engineering*, Edited by R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti, Academic Press, 1663-1683p.
- [19] Hocquette, J.F. (2016). Is in vitro meat the solution for the future?. *Meat Science*, 120, 167-176.
- [20] Chriki, S., Picard, B., Faulconnier, Y., Micol, D., Brun, J.P., Reichstadt, M., Juire, C., Durand, D., Renand, G., Journaux, R., Hocquette, J.F. (2013). A data warehouse of muscle characteristics and beef quality in France and a demonstration of potential applications. *Italian Journal of Animal Science*, 12(2), e41.
- [21] Bhat, Z.F., Bhat, H. (2011). Animal-free meat biofabrication. *American Journal of Food Technology*, 6(6), 441-459.
- [22] Anomaly, J. (2020). Antibiotics and Animal Agriculture: The need for global collective action. In *Ethics and Drug Resistance*, Edited by Selgelid and Jamrozik, Springer Publishing.
- [23] Tesson, V., Federighi, M., Cummins, E., de Oliveira Mota, J., Guillou, S., Boué, G. (2020). A systematic review of beef meat quantitative microbial risk assessment models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(3), 688.
- [24] Seman, D.L., Quickert, S.C., Borger, A.C., Meyer, J.D. (2008). Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in cured ready-to-eat meat products by use of sodium benzoate and sodium diacetate. *Journal of Food Protection*, 71(7), 1386-1392.
- [25] Ashley, B. (2002). Edible weights of wildlife species used for country food in the Northwest Territories and Nunavut. Wildlife and Fisheries Division, Department of Resources, Wildlife and Economic Development, Government of the Northwest Territories, Canada.
- [26] Bellarby, J., Tirado, R., Leip, A., Weiss, F., Lesschen, J.P., Smith, P. (2013). Livestock greenhouse gas emissions and mitigation potential in Europe. *Global Change Biology*, 19(1), 3-18.
- [27] Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., Tempio, G. (2013). Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italy.
- [28] Weiss, F., Leip, A. (2012). Greenhouse gas emissions from the EU livestock sector: a life cycle assessment carried out with the CAPRI model. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 149, 124-134.

- [29] Tuomisto, H.L., Teixeira de Mattos, M.J. (2011). Environmental impacts of cultured meat production. *Environmental Science and Technology*, 45(14), 6117-6123.
- [30] Tuomisto, H.L., Roy, A.G. (2012). Could cultured meat reduce environmental impact of agriculture in Europe. Proceedings of The 8th International Conference in Life Cycle Assessment in The Agri-Food Sector, Oct 1-4, 2012, Saint-Malo, France, 615-619p.
- [31] Tuomisto, H.L. (2019). The eco-friendly burger. *EMBO Reports*, 20(1), 1-6.
- [32] Zhang, G., Zhao, X., Li, X., Du, G., Zhou, J., Chen, J. (2020). Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat. *Trends in Food Science and Technology*, 97, 443-450.
- [33] Warner, R.D. (2019). Analysis of the process and drivers for cellular meat production. *Animal*, 13(12), 3041-305.
- [34] Siegrist, M., Sütterlin, B., Hartmann, C. (2018). Perceived naturalness and evoked disgust influence acceptance of cultured meat. *Meat Science*, 139, 213-219.
- [35] Verbeke, W., Marcu, A., Rutsaert, P., Gaspar, R., Seibt, B., Fletcher, D., Barnett, J. (2015). 'Would you eat cultured meat? : Consumers' reactions and attitude formation in Belgium, Portugal and the United Kingdom. *Meat Science*, 102, 49-58.
- [36] Costa, F.S., Cabral, A.R., Silva, S.L., Silva, M.A., Henrique, W., Mazalli, M.R., Baldi, F.S., Mueller, L.F., Adrielle, M.F., Corte, R.R.P.S., Pereira, A.S.C. (2020). Effects of n-3 and n-6 feeding sources on the quality and lipid oxidation of meat from feedlot-finished *Bos indicus* steers. *Meat Science*, 161, 107966.
- [37] Dumont, B., Jouven, M., Bonaudo, T., Botreau, R., Sabatier, R. (2017). A framework for the design of agroecological livestock farming systems. In *Agroecological practices for sustainable agriculture—principles, applications, and making the transition*, Edited by A. Wesel, World Scientific, Lyon, France, 263-291p.
- [38] Petetin, L. (2014). Frankenburgers, risks and approval. *European Journal of Risk Regulation*, 5(2), 168-186.
- [39] Mancini, M.C., Antonioli, F. (2019). Exploring consumers' attitude towards cultured meat in Italy. *Meat Science*, 150, 101-110.
- [40] Bryant, C.J., Szejda, K., Deshpande, V., Parekh, N., Tse, B. (2019). A survey of consumer perceptions of plant-based and clean meat in the USA, India, and China. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 11.
- 
-

## Bakteriyosinler: Sınıflandırılmaları, Etki Mekanizmaları ve Gıda Muhafazasında Kullanımları

Cesur Mehenktaş  

Ege Üniversitesi, Tire Kutsan Meslek Yüksekokulu, 35900, Tire, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 05.07.2018, Kabul Tarihi (Accepted): 01.10.2018

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): cesur.mehenktaş@ege.edu.tr (C. Mehenktaş)

☎ 0 232 512 86 16 📠 0 232 512 86 16

### ÖZ

Bakteriyosinler çeşitli bakteri türleri tarafından üretilen ve diğer mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici veya öldürücü etki gösteren peptitlerdir. Sahip oldukları bu etkiler nedeniyle, bakteriyosinler gıda muhafazasında da kullanılmaktadır. Bu derlemede, bakteriyosin üreten bakteri türleri, bakteriyosinlerin sınıflandırılması, etki mekanizmaları, laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinler ve bakteriyosinlerin gıda muhafazasında kullanımı konuları ele alınmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyosinler, Laktik asit bakterileri, Gıda muhafazası

### Bacteriocins: Their Classification, Mechanisms of Action and Use in Food Preservation

#### ABSTRACT

Bacteriocins are peptides produced by various bacteria species and having inhibitory or killing effect on other microorganisms. Because of these effects, bacteriocins are also used in food preservation. In this review, bacteria species producing bacteriocins, classification of bacteriocins, their mechanisms of action, bacteriocins produced by lactic acid bacteria and use of bacteriocins in food preservation were discussed.

**Keywords:** Bacteriocins, Lactic acid bacteria, Food preservation

### GİRİŞ

Tüm canlı organizmalar, nispeten küçük boyutlarından dolayı birçoğuna antimikrobiyal peptitler denilen antimikrobiyal proteinler üretirler. Ökaryotların bağışıklık sisteminde, antimikrobiyal proteinlerin konakçıyı düşmanlara karşı korumada ilk savunma hattı olarak görev yaptığına inanılmaktadır. Bakteriler iki tür antimikrobiyal protein üretirler: ribozomal olarak sentezlenenler (bunlar bakteriyosinler olarak da bilinirler) ve yapısal gen kodlaması olmayan, ribozomal olarak sentezlenmeyen antimikrobiyal proteinler (örneğin  $\epsilon$ -poli-L-lisin) [1]. Bakteriyosinler; bakteriler tarafından ribozomal olarak sentezlenen ve diğer ilgili olan veya olmayan mikroorganizmaları inhibe eden ya

da öldüren peptitler veya proteinler olarak tanımlanmaktadır [2].

Laktik asit bakterileri, gıda fermantasyonlarının yanı sıra, fermente gıda ürünlerinde tat ve tekstürü geliştirmede kullanılan en önemli mikroorganizmalar arasındadır [3]. Glikozdan başlıca ürün olarak laktik asit ve gıdaların bozulmasına yol açan bakteriler ve patojenlerin üremesini engelleyen bakteriyosinler, hidrojen peroksit, diaçiller vb üreme önleyici maddelerin üretimi ile karakterize edilirler [4].

#### BAKTERİYOSİN ÜRETEN TÜRLER

Bakteriyosinler çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türleri tarafından üretilmektedir: toprak

bakterileri *Bacillus brevis* Bb ve *Pseudomonas aeruginosa* Pa tarafından üretilen bacillocin Bb ve pyocin Pa bakteriyosinleri; *Staphylococcus aureus* suşları tarafından üretilen aureocin A 53 ve aureocin A 70 bakteriyosinleri; geniş getiren hayvanlarla ilgili bakteri *Streptococcus bovis* tarafından üretilen geniş getiren hayvan bakteriyosinleri; *Rhodobacter capsulatus* ATCC 17016 tarafından üretilen bakteriyosin; laktik asit bakterilerinin ürettiği farklı isimlerle anılan bakteriyosinler [5]. Bakteriyosinler taksonomik olarak yakın bakterileri inhibe edecek şekilde dar spektrumlu ya da çok çeşitli bakterileri inhibe edecek şekilde geniş spektrumlu olabilmektedirler [6].

Bakteriyosinlere ilişkin bilgi ilk olarak 1925'te araştırmacılar *Escherichia coli* V suşu tarafından üretilen biyolojik olarak aktif bir maddenin, aynı türün diğer bir suşuna (*E. coli* F) karşı antagonistik etkiye sahip olduğunu belirlediklerinde yayınlanmıştır. Daha sonra, *E. coli* tarafından üretilen benzer antimikrobiyal maddeler bulunmuş ve bunlara "kolisinler" adı verilmiştir [5]. Bakteriyosinler ilk olarak Gram-negatif bakterilerde tanımlanmıştır. *E. coli*'nin kolisinleri, üzerinde en çok çalışılmış olan bakteriyosinlerdir. Kolisinler; hücre duvarı sentezini önleme, hedef hücre zarını geçirgenleştirme veya RNaz ya da DNaz aktivitesini önleme gibi çeşitli mekanizmalarla yakından ilgili bakterileri öldüren, farklı bir antibakteriyel proteinler grubunu oluşturur [7].

Laktik asit bakterileri; düşük pH değerlerine yüksek tolerans gösteren, Gram-pozitif, spor oluşturmeyen, kok veya çubuk şeklinde, katalaz-negatif ve zor beğenen bir mikroorganizmalar grubudur [4]. Laktik asit bakterileri son elektron alıcısı olarak oksijen yerine endojen karbon kaynaklarını kullanarak, enerji elde etmek amacıyla karbonhidratları fermente ederler. Fermente edilen karbonhidratların ürünlerine bağlı olarak homofermentatif ve heterofermentatif mikroorganizmalar şeklinde sınıflandırılırlar. Homofermentatif laktik asit bakterileri şekerlerden başlıca laktik asit üretirken, heterofermentatif laktik asit bakterileri laktik asit, asetik asit veya alkol ve karbondioksit üretirler. Ayrıca, bazı laktik asit bakterileri bakteriyosin üretirler [8]. Genel olarak bakteriyosinler; belirli konsantrasyonlarda belirgin antimikrobiyal aktiviteye sahip, ribozomal olarak üretilen, çok işlevli protein yapıda maddeler olarak tanımlanabilmektedir [1]. Gram-pozitif bakteriler arasında laktik asit bakterilerinden, gıda uygulamalarında antimikrobiyal peptit kaynağı olarak geniş ölçüde yararlanılmaktadır [7].

## BAKTERİYOSİNLERİN SINIFLANDIRILMASI

Bakteriyosinler primer yapıları, molekül ağırlıkları, translasyon sonrası değişiklikleri ve genetik özelliklerine göre sınıflandırılırlar [8]. Genellikle üç veya dört gruba ayrılırlar. Ancak, bakteriyosinlerin sınıflandırılması, yeni moleküllerin bulunmasıyla ortaya çıkan benzerlik ve farklılıklara bağlı olarak sürekli güncellenmektedir [7].

### Sınıf I Bakteriyosinleri

Bu sınıftaki bakteriyosinler, küçük peptitlerdir (<5 kDa, 19-37 amino asit) [9]. Sınıf I bakteriyosinlerine

lantibiotikler denmektedir ve bunlar translasyon sonrası modifikasyonlarına göre ayırt edilirler [10]. Bu sınıftaki bakteriyosinler lantionin, metillantonin, dehidrobütirin ve dehidroalanin gibi ender amino asitleriyle karakterize edilirler [7]. Nisin ve lactocin bu sınıfın tipik örnekleridir [10]. Yaklaşık 60 lantibiotik bilinmektedir ve bunların %30'u laktik asit bakterilerinden saflaştırılmıştır [11]. Bu bakteriyosinler translasyon sonrası modifiye olmuş, ısıya dayanıklı peptitlerdir ve özellikle Gram-pozitif bakteriler olmak üzere genellikle patojenlerin hücre duvarının iskeletini hedefleyerek etkilerini gösterirler [9]. Sınıf I, Sınıf Ia ve Sınıf Ib'ye ayrılır [7].

### Sınıf Ia Bakteriyosinleri

Bu peptitler, bakterileri gözenek oluşumu ile öldüren, pozitif yüklü, uzun bakteriyosinlerdir. Prototip antibiyotik nisin bu grubun bir üyesidir [12]. Sınıf Ia bakteriyosinleri, hedef hücre zarlarında gözenekler oluşturan ve daha rijit yapıdaki Sınıf Ib'ye kıyasla esnek bir yapıya sahip olan katyonik ve hidrofobik peptitlerden oluşur [7].

### Sınıf Ib Bakteriyosinleri

Bu sınıf lacticin 481, cytolysin ve salivaricin'i içerir [12]. Küre şeklinde peptitler olan Sınıf Ib bakteriyosinleri, net yüke veya net negatif yüke sahip değildirler [13]. Bunlar, duyarlı bakterilerin yaşamlarını destekleyen proseslerin yerine getirilmesi için gereksinim duyulan çeşitli katalitik enzimleri inhibe ederler [12].

### Sınıf II Bakteriyosinleri

Sınıf II bakteriyosinleri ısıya dayanıklı, küçük (<10 kDa), lantibiotik olmayan veya modifiye olmamış ya da pediocin benzeri antibiyotiklerdir [14]. Bunlar katyonik, hidrofobik peptitlerdir [8]. İzoelektrik noktaları 8.3 ile 10.0 arasında değişir ve yapılarında Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys [YGNQV(X)C(X)4C(X)V(X)4A] şeklindeki hidrofilik özellikte N-terminal konsensus dizisinin bulunması ile ayırt edilirler [14]. Sınıf II de alt sınıflara ayrılır [7].

### Sınıf IIa Bakteriyosinleri

Geleneksel sınıflandırmaya göre, Sınıf IIa pediocin benzeri, *Listeria*'ya karşı etkili peptitleri içerir [7]. Bu grubun tipik bakteriyosinleri leucocin A, acidocin A, mesentericin, pediocin PA1 ve sakacin P'dir [9]. Fermente et, fermente sebze, süt ürünleri, tütsülenmiş somon ve insan sindirim sisteminden yaklaşık 50 farklı Sınıf IIa bakteriyosini izole edilmiştir. Sınıf IIa peptitleri, pediocin PA1 ve leucocin A gibi örnekleriyle gıda muhafazasında dikkat çekmektedir [8].

### Sınıf IIb Bakteriyosinleri

İki farklı peptitten meydana gelen bakteriyosinler, Sınıf IIb'yi oluşturur. İki peptitli bakteriyosinler her iki peptidin de tamamen aktif olmasına gereksinim gösterir. Peptitlerin primer amino asit dizilişleri farklıdır. Her biri kendisine bitişik genler tarafından kodlanmasına karşın, yalnızca bir bağışıklık genine gereksinim duyulur [7]. Sınıf IIb bakteriyosinleri genellikle sinerjistik şekilde

görev yaparlar. Bu peptitler ayrı ayrı incelendiğinde ya az miktarda aktivite gösterirler ya da hiç aktivite göstermezler. Lactococcin G ve plantaricin'ler bu sınıfın örnekleridir [15]. Bu sınıftaki bazı peptitler bireysel olarak antimikrobiyal aktivite gösterebilmelerine rağmen, tamamlayıcı peptit ilavesi bu aktiviteyi büyük ölçüde arttırmaktadır. Tamamlayıcı peptit çifti nanomol ile pikomol aralığındaki düzeylerde aktiftir. Bireysel Sınıf IIb bakteriyosinleri amfifilik (suda çözünen ve çözünmeyen fonksiyonel grupları birlikte içeren) ve hidrofobik bölgeler içerirler ve çoğunlukla katyoniktirler. İki farklı peptidi kodlayan genler genetik olarak yakından ilgilidirler ve bu peptitler aynı kalıtı bölgesinde kodlanırlar [16].

### Sınıf IIc Bakteriyosinleri

Bunlar küçük, ısıya dayanıklı peptitler olup, öncü peptitler tarafından taşınırlar. İki gruba ayrılırlar: thiolbiotikler ve sistibiotikler. Thiolbiotikler iki sistein kalıntısına, sistibiotikler ise bir sistein kalıntısına sahip bakteriyosinlerdir. Lactococcin A, divergicin A ve acidocin B, Sınıf IIc'de bulunan bakteriyosinlerdir [9]. Başlangıçta Sınıf IIc'nin, genel salgı sistemi tarafından salgılanan bakteriyosinleri içerdiği öne sürülmekteydi. Daha sonra, Sınıf IIa bakteriyosinlerinin bu salgı sistemini kullanabildiği gösterilmiş ve bu nedenle IIc alt sınıfı iptal edilmiştir [7].

### Sınıf III Bakteriyosinleri

Büyük ve ısıya dayanıksız bakteriyosinler, haklarında çok az bilgi bulunan Sınıf III bakteriyosinlerini oluşturur [7]. Sınıf III bakteriyosinleri büyük (>30 kDa) peptitlerdir, örneğin zoocin A, lysostaphin, helveticin J ve helveticin V. Bu bakteriyosinler ısıya duyarlı litik bakteriyosinler ve ısıya duyarlı litik olmayan bakteriyosinler şeklinde sınıflandırılırlar. Litik bakteriyosinler genellikle bakterilerin hücre duvarını enzimatik yolla lize eden (eriten) endopeptidaz peptitleridir. Litik bakteriyosinlerin yanı sıra ısıya duyarlı, yüksek molekül ağırlıklı, litik etki şekline sahip olmayan bazı bakteriyosinler de bulunmuştur, örneğin *Lactobacillus helveticus* 481'in ürettiği helveticin J, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* W2580'in ürettiği dysgalacticin, streptococcin A-M57 [9].

### Sınıf IV Bakteriyosinleri

Daha önceden Sınıf IV olarak adlandırılan bakteriyosin sınıfı, proteinlerin diğer makromoleküllerle oluşturduğu büyük komplekslerden meydana gelmektedir [8]. Lipit veya karbonhidrat kısımları içeren bu kompleks bakteriyosinler glikolitik veya lipolitik enzimlere karşı hassastırlar, örneğin plantaricin S ve leuconocin S [9]. Ancak halihazırda bu tür herhangi bir bakteriyosin saflaştırılmamıştır ve bu tür bir bakteriyosinin, bakteriyosinlerin ham ekstrakt içerisindeki diğer makromoleküllerle kompleks oluşturması ile sonuçlanan katyonik ve hidrofobik özelliklerinden kaynaklanan yapay bir madde olduğu düşünülmektedir [7]. Dolayısıyla, bu sınıf kaldırılmıştır ve içerdiği peptitler bakteriolisinler, yani hidrolitik polipeptitler olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Sonuç olarak günümüzde, içerdiği

bakteriyosinlerin genetik ve biyokimyasal özelliklerine göre üç bakteriyosin sınıfı bulunmaktadır [8].

## BAKTERİYOSİNLERİN ETKİ MEKANİZMALARI

Bakteriyosinler farklı etki mekanizmalarına sahiptirler ve hücre lizisine neden olarak veya olmaksızın bakterisit etki gösterenler ve hücre çoğalmasını önleyerek bakteriyostatik etki gösterenler olarak ikiye ayrılabilirler [17]. Laktik asit bakterilerinin ürettiği bakteriyosinlerin çoğu, özellikle Gram-pozitif bakterileri inhibe edenler, antibakteriyel etkilerini hücre zarfı ile ilgili mekanizmaları hedefleyerek ortaya koyarlar [18]. Bazı lantibiotikler ve bazı Sınıf II bakteriyosinleri, bakteri hücre zarfı içerisindeki peptidoglikan biyosentez mekanizmasında bir ara ürün olan Lipid II'yi hedefler ve bu yolla peptidoglikan sentezini önlerler [19]. Diğer bazı bakteriyosinler Lipid II'yi gözenek oluşumunu kolaylaştırmak için kenetlenme molekülü olarak kullanırlar. Bu durum sitoplazma membran potansiyelinde değişime ve sonunda da hücre ölümüne neden olur [20]. Üzerinde en çok çalışılmış lantibiotik olan nisin ise her iki mekanizmayı da gerçekleştirebilmektedir [2]. Bazı bakteriyosinler, hücre zarfıyla ilgili mannoz fosfotransferaz sistemine bağlanıp, ardından hücre zarfında gözenekler oluşturarak hedef hücrelere zarar verirler veya onları öldürürler [18]. Bazı bakteriyosinler ise hedef hücrelerini, gen ekspresyonunu ve protein üretimini önleyerek öldürebilirler [19].

## LAKTİK ASİT BAKTERİLERİNİN ÜRETTİĞİ BAKTERİYOSİNLER

Laktik asit bakterileri tarafından bakteriyosin sentezlenmesi ilk olarak 1928'de bildirilmiştir. Bu biyolojik olarak aktif madde daha sonra kimyasal açıdan polipeptit olarak tanımlanmış ve nisin adı verilmiştir. Çeşitli laktik asit bakteri cinsleri tarafından üretilen bakteriyosinlere ilişkin artan bir ilgi söz konusudur ve sürekli olarak yeni bilgiler ortaya konmaktadır [5].

Laktik asit bakterileri fermente gıdaların üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır ve üzerinde en çok çalışılan mikroorganizmalar arasındadır [5]. Laktik asit bakterileri, laktozu laktik aside çevirmenin yanı sıra, diğer organik asitler, diasetil, asetoin, hidrojen peroksit, antifungal peptitler ve bakteriyosinler gibi antimikrobiyal moleküller üretmek üzere uzun zamandan beri çeşitli gıda fermantasyonlarında kullanılmaktadır [21]. Geleneksel fermente ürünlerdeki yaygın kullanımlarının sonucu olarak, çoğu laktik asit bakterisi FDA tarafından GRAS (genel olarak güvenilir kabul edilen) kabul edilmektedir. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve bazı *Streptococcus*'lar gibi çoğu laktik asit bakterisi cinsine Nitelikli Güvenilirlik Varsayımı (QPS) statüsünü vermiştir. Ancak, *Enterococcus* cinsine ait türler ve bazı *Streptococcus*'lar patojendir, bu nedenle GRAS statüsüne sahip değildirler ve QPS statüsü için önerilmemişlerdir [19].

Laktik asit bakterilerinin bakteriyosinleri çoğunlukla çeşitli pH değerlerinde aktiftir, yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır ve gıdalardaki çeşitli patojen ve bozulmaya

neden olan bakterilere karşı etkilidir [9]. Ayrıca, bu bakteriyosinler pankreatin kompleksi, tripsin ve kimotripsin gibi sindirimle ilgili proteazlara karşı

hassastır ve bu nedenle bağırsak mikroflorasını olumsuz etkilemez [21]. Laktik asit bakterileri tarafından üretilen bazı bakteriyosinlerin özellikleri Tablo 1'de verilmiştir [8].

Tablo 1. Laktik asit bakterilerince üretilen bakteriyosinlerin sınıf ve özellikleri  
*Table 1. Class and properties of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*

Sınıf	Bakteriyosin Üreten Tipik tür	Özellikler	Örnekler
I	<i>Lactobacillus lactis subsp. lactis</i>	Ender amino asitler (lantionin ve metillantionin) içerir; <5 kDa	Nisin, lactocin, mersacidin
IIa	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Isıya dayanıklı, modifiye olmamış, katyonik, hidrofobik peptitler; çift-glisinli öncü peptit içerir; pediocin benzeri peptitler; <10 kDa	Pediocin PA1, sakicin A, leucocin A
IIb	<i>Enterococcus faecium</i>	Birbirini tamamlayıcı iki peptidin sinerjisine gereksinim gösterir; çoğunlukla katyonik peptitler	Lactococcin G, plantaricin A, enterocin X
IIc	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Hücre zarı geçirgenliğini ve hücre duvarı oluşumunu etkiler	Acidocin B, enterocin P, reuterin 6
III	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Isıya duyarlı; büyük molekül ağırlıklı peptitler; >30 kDa	Lysostaphin, enterolysin A, helveticin J

## BAKTERİYOSİNLERİN GIDA MUHAFAZASINDA KULLANIMI

Gıdalara raf ömrünü uzatmak amacıyla, mikrobiyal gelişimi ve olası bozulmaları geciktirmek için antibiyotikler veya gıda koruyucuları (örneğin nitrit ve күкүрт dioksit) ilave edilmektedir. Ancak, çoğu ticari koruyucu kimyasal sentez yoluyla üretilmektedir ve sentetik koruyucuların uzun süreli tüketimi insan vücudunda olumsuz etki gösterebilmektedir. Ayrıca, gıda ürünlerinde antibiyotiklerin kullanımı yasal değildir. Gram-pozitif veya Gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genler tarafından kodlanmış, gıda ürünlerinde doğal koruyucular olarak kullanımı uygun olan peptit veya proteinlerdir [22].

Gıdalara uygulanacak bakteriyosinlerin seçimi bazı önemli kriterlerin yerine getirilmesini gerektirir. Bakteriyosin üreten suşlar gıdada kullanılabilir olmalıdır (GRAS veya QPS), geniş bir inhibisyon spektrumu sergilemelidir, yüksek spesifik aktivite göstermelidir, sağlık riski taşımamalıdır, yararlı etkiler göstermelidir (örneğin, gıdaların güvenilirliğini, kalitesini ve lezzetini arttırmalıdır), belirli bir gıda için ısı ve pH stabilitesine, optimum çözünürlüğe ve stabiliteye sahip olmalıdır [2]. Çeşitli gıda kaynaklı patojenlerin bakteriyosinler tarafından inaktive edilmesinin, kullanılan gıda matrisine bağlı olarak büyük ölçüde farklılık gösterebileceği belirtilmektedir. Bu nedenle, farklı bakteriyosinlerin gıda kaynaklı patojenlere karşı etkinliği tüm gıda sistemlerinde denenmelidir [19].

## Gıdalara Uygulama Yöntemleri

Bakteriyosinleri içeren gıda uygulamalarının çoğu üç sınıfa ayrılabilir: Kısmen saflaştırılmış bakteriyosinler (örneğin %2.5 nisin içeren Nisaplin®), bakteriyosinleri ham fermentat şeklinde içeren fermente süt ve diğer fermente gıda ürünleri (örneğin Micro-GARD® bakteriyosin içeren ürünler grubu) ve bakteriyosin üreten koruyucu kültürler [1]. Bakteriyosin üreten laktik asit bakterisi suşlarını antibakteriyel starter kültür ve koruyucu

kültür olarak uygulamak, yarı saflaştırılmış/saflaştırılmış bakteriyosinlerin kullanımına göre avantaj oluşturabilir. Çoğu durumda, bakteriyosinler gıda matrisine adsorbe edilmekte ve kolayca bozulmakta, bu durum antibakteriyel aktivitede kayba yol açmaktadır. Bu nedenle, alternatif bir yöntem bakteriyosinleri gıda ambalajlama filmlerine/kaplamalarına dahil ederek, karmaşık gıda sistemlerindeki aktivite ve stabiliteyi arttırmaktır [19].

## Ticari Bakteriyosinler

Bakteriyosinler et ve süt ürünleri gibi normalde laktik asit bakterilerini içeren gıdalardan izole edildikleri için, bunlar farkında olmaksızın yüzlerce yıldır tüketilmektedirler. *Lactococcus lactis*'in 40 yabancı suşu üzerinde yapılan bir çalışmada, bu suşların 35'inin nisin ürettiği belirlenmiştir [7]. Nisin, FDA onaylı GRAS statüsüne sahip olan bir bakteriyosindir [1]. Nisin kullanımı 40'tan fazla ülkede onaylanmıştır ve 50 yıldan uzun bir süredir bir gıda koruyucusu olarak kullanılmaktadır. Ancak, nisin üreten bir starter kültür ile doğal olarak fermente edilmiş bir gıdada bulunandan daha yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında "doğal" kabul edilmez [7].

*Listeria monocytogenes* buzdolabı sıcaklıklarında bile düşük nem içeriğinde gelişen yaygın bir et patojenidir. Bu konuyla ilgili ABD'de çok katı bir politika yürütülmekte olup, hazır gıdalarda *Listeria monocytogenes* için tolerans düzeyi sıfır olarak belirlenmiştir [9]. Pediocin PA1 et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* gelişimini önleyen bir bakteriyosindir ve Alta® 2341 adıyla piyasada bulunmaktadır [23]. Halen, sadece nisin (Nisaplin, Danisco) ve pediocin PA1 (Microgard™, ALTA 2431, Quest) gıda koruyucusu olarak ticari anlamda kullanılmaktadır [24].

## KAYNAKLAR

- [1] Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., Dicks, L. MT. (2018). Functions and emerging



- applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 23-28.
- [2] Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- [3] Hati, S., Mandal, S., Prajapati, J.B. (2013). Novel starters for value added fermented dairy products. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 1, 83-91.
- [4] De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194-199.
- [5] Beshkova, D., Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 419-432.
- [6] Mills, S., Serrano, L., Griffin, C., O'connor, P.M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R.P., Meijer, W.C. (2011). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *Microbial Cell Factories*, 10, S7.
- [7] Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- [8] Mokoena, M.P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22, 1255.
- [9] Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Al Karaawi, M.A., Siddiqui, M.U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49, 1-11.
- [10] Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., Socol, C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 521-542.
- [11] Bierbaum, G., Sahl, H.G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 2-18.
- [12] Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- [13] Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G. (2000). Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2565-2571.
- [14] Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564-582.
- [15] Gong, H.S., Meng, X.C., Wang, H. (2009). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from 'Jiaoke', a traditional fermented cream from China. *Food Control*, 21, 89-96.
- [16] Diep, D.B., Mathiesen, G., Eijsink, V.G.H., Nes, I.F. (2009). Use of lactobacilli and their pheromone-based regulatory mechanism in gene expression and drug delivery. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 62-73.
- [17] da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J.M.D., De Souza Oliveira, R.P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.
- [18] Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013). Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11, 95-105.
- [19] Silva, C.C.G., Silva, S.P.M., Ribeiro, S.C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 594.
- [20] Machaidze, G., Seelig, J. (2003). Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments. *Biochemistry*, 42, 12570-12576.
- [21] Egan, K., Field, D., Rea, M.C., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. (2016). Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Frontiers in Microbiology*, 7, 461.
- [22] Yang, S.C., Lin, C.H., Sung, C.T., Fang, J.Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5, 241.
- [23] Settanni, L., Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138.
- [24] Simha, B.V., Sood, S., Kumariya, R., Garsa, A.K. (2012). Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application. *Microbiological Research*, 167, 544-549.

## Akademik Gıda Dergisi Yazım Kuralları

**Akademik Gıda** dergisi gıda bilimi ve teknolojisi alanında hazırlanmış özgün araştırma ve derleme makalelerin yayınlandığı **hakemli** bir dergidir. Araştırma notu, mini derleme, görüş ve editöre mektup gibi yazılar da yayın için değerlendirilir. Dergi 3 ayda bir basılmakta olup 4 sayıda bir cilt tamamlanır. Dergide Türkçe ve İngilizce makaleler yayınlanır.

Akademik Gıda dergisinde yayınlanması istenen çalışmalar derginin [www.academicfoodjournal.com](http://www.academicfoodjournal.com) web sayfasında bulunan elektronik makale gönderim sistemi üzerinden gönderilmelidir. E-posta ile gönderilen makaleler değerlendirilmeyecektir. Elektronik makale gönderim sistemi ile ilgili sorularınız için [ogursoy@yahoo.com](mailto:ogursoy@yahoo.com) e-posta adresinden editörlere irtibata geçebilirsiniz.

- Gönderilecek çalışmanın dergide hangi tür makale olarak (Araştırma Makalesi, Derleme Makale, Araştırma Notu, Mini Derleme, Görüş ve Editöre Mektup) yayınlanması istendiği yazar(lar) tarafından mutlaka belirtilmelidir.
- Yazar(lar) tarafından çalışmayı değerlendirebileceği düşünülen ve yazar(lar)la çıkar çatışması/çakışması olmayan en az 3 potansiyel hakem iletişim bilgileri de (yazışma adresi, e-posta ve telefon numarası) verilerek önerilmelidir. Önerilecek hakemler yazarın kendi kurumu dışından olmalıdır.
- Gönderilecek çalışmalar yazım ve imla hataları içermemelidir. İngilizceden Türkçeye tercüme edilen teknik terimler "Gıda Mühendisliği Teknik Terimler Rehberi"nde [Gıda Mühendisleri Odası, Kitaplar Serisi No: 17, Filiz Matbaacılık, Ankara, 232s, ISBN: 978-9944-89-407-4] tavsiye edilen şekliyle kullanılmalıdır.
- Gönderilen çalışmaların daha önce hiç bir yerde yayınlanmadığı yazar(lar) tarafından garanti edilmelidir.
- Yayın Kurulu yayına kabul edilmiş çalışmalarda gerekli değişiklikleri yapmaya yetkilidir.

### Makalelerin Değerlendirilmesi

Yayımlanmak üzere Akademik Gıda dergisine gönderilen çalışmalar öncelikle Editörlerin ön incelemesinden geçmektedir. İlk incelemeyi geçen çalışmalar, değerlendirilmek üzere en az iki bağımsız hakeme gönderilmektedir. Çalışmaların değerlendirilmesinde hakemlerin makale yazar(lar)ını, makale yazar(lar)ının hakemleri görmediği çift-kör (double-blind) değerlendirme sistemi kullanılmaktadır. Editörler (i) dergi kapsamı dışında olan, (ii) teknik açıdan yetersiz, (iii) kendi içerisinde bütünlük ve

tutarlılık arz etmeyen sonuçlar içeren veya (iv) kötü yazılmış çalışmaları doğrudan reddetme hakkına sahiptir.

### Yazım Ücreti

Akademik Gıda dergisinde makale yayınlanması için herhangi bir ücret talep edilmemektedir.

### Etik Beyanı

Dergi yayın politikası, makalelerin değerlendirilmesi ve etik hususlar ile ilgili detaylı bilgilere Etik Beyanı kısmından ulaşılabilir.

### Çalışmaların Hazırlanması

1. Çalışmalar A4 boyutunda hazırlanmalı, üstten 2.45 cm, alttan 2.45 cm, sağ ve soldan 1.75 cm boşluk bırakılmalı ve tek kolon olarak hazırlanmalıdır. Metin çift satır aralıklı yazılmalı, paragraflar arasında tek satır boşluk bırakılmalıdır. Metinde bütün satırlar (sürekli) numaralandırılmalıdır.

2. Çalışma başlığı 14 punto Arial, koyu, küçük harflerle ve ortalanmış olarak yazılmalıdır. Başlıktan sonra bir satır boşluk bırakılmalı (11 punto); yazar isimleri (yalnızca ilk harfler büyük) 10 punto Arial ve ortalanmış olarak verilmelidir. Yazarların adresleri, telefon ve faks bilgileri ile yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi hemen alt satırda 9 punto Arial, ilk harfler büyük olacak şekilde ve ortalanmış olarak yazılmalıdır. Yazarların çalıştıkları kuruluşlar (ve/veya adresler) farklı ise her bir yazar isminin sonuna rakamlarla üst indis konulmalıdır.

3. Metin içindeki kısımların başlıkları (ÖZ, ABSTRACT, GİRİŞ vb.) 10 punto Arial ve koyu olarak büyük harflerle yazılmalı, başlıktan sonra bir satır boşluk bırakılarak metine geçilmelidir. Alt başlıklarda ilk harfler büyük, 10 punto Arial ve koyu yazı karakteri kullanılmalıdır. ÖZ'ün altına bir satır boşluk bırakıldıktan sonra en fazla 5 adet Anahtar Kelime konmalıdır. Anahtar Kelimelerden sonra bir satır boşluk bırakılarak İngilizce başlık ve altına ABSTRACT ve Keywords yazılmalıdır. Bir satır boşluk bırakılarak ana metine geçilmelidir.

4. Ana metin 9.5 punto Arial olarak hazırlanmalıdır.

5. Çalışma başlıca şu kısımlardan oluşmalıdır: Başlık, Yazar İsimleri, Adresleri, İletişim Bilgileri, Yazışmalardan Sorumlu Yazarın E-posta adresi, Öz,

Abstract, Ana Metin (Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular ve Tartışma, Sonuç), Teşekkür (gerekliyse), Kısaltmalar (gerekliyse), Kaynaklar.

6. Öz ve Abstract 250 kelimeyi geçmemeli, çalışmanın amacını, metodunu ve önemli sonuçlarını içermelidir. Öz tek paragraf olarak yazılmalı ve öz içinde kaynaklara atıf yapılmamalıdır.

7. Çalışma içerisinde geçen mikroorganizma isimleri ile Latince ifade ve isimler italik olarak yazılmalı ve kısaltmalarda uluslararası yazım kuralları göz önünde bulundurulmalıdır.

8. Tablo başlıkları tablonun üstüne, şekil başlıkları ise şeklin altına yazılmalı ve numaralandırılmalıdır. Kullanılan tablo ve şekillere metin içinde mutlaka atıf yapılmalıdır. Metin içinde geçen veriler tablo ve şekillerin tekrarı olmamalıdır. Tablo ve şekillerin başlıkları içerikleriyle uyumlu ve anlaşılabilir olmalıdır. Şekiller ve resimlerin yüksek çözünürlükte olmasına dikkat edilmelidir. Resimler (ve gerekiyorsa Şekiller) \*.jpg formatında metin içerisinde yer almalıdır.

9. Metin içerisinde atıflar köşeli parantez içerisinde rakamlarla yapılmalı [1] ve Kaynaklar bölümünde bu numara sırasıyla detayları yazılmalıdır. Kaynakların numaralandırılması MS Word Numaralandırma Kitaplığı kullanılarak yapılmalıdır.

10. Kullanılan matematiksel denklemler numaralandırılmalı ve metin içerisinde bu denklemlere atıf yapılmalıdır.

11. Kaynaklar kısmı APA yazım stili kullanılarak hazırlanmalıdır. Kaynakların yazımında aşağıdaki örnek yazım biçimleri kullanılmalı ve makalelerin yayınlandığı dergi isimleri kısaltma kullanılmadan ve italik olarak yazılmalıdır. Web adreslerine atıf yapılacağına (mümkün olduğunca Resmi web sayfalarına atıf yapılmalıdır) mutlaka ilgili web adresine erişim tarihi verilmelidir.

## Makale

- [1] Bozkurt, H., İçier, F. (2009). İnegöl köfte üretiminde ohmik pişirmenin uygulanabilirliğinin incelenmesi. *Akademik Gıda*, 9(1), 6-12.

## Kitap

- [2] Kılıç, S. (2001). Süt Endüstrisinde Laktik Asit Bakterileri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, İzmir.

## Kitap Bölümü

- [3] Gibson, G.R., Saavedra, J.M., MacFarlane, S., MacFarlane, G.T. (1997). Probiotics and Intestinal Infections. In Probiotics 2: Applications and Practical Aspects, Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, England, 212p.

## Kongre-Sempozyum Bildirisi

- [4] Gürsoy, O., Akdemir, O., Hepbaşlı, A., Kınık, Ö. (2004). Recent situation of energy consumption in Turkey dairy industry. *International Dairy Symposium: Recent Developments in Dairy Science and Technology*, May 24-28, 2004, Isparta, Turkey, Book of Proceedings, 10-16p.

12. Hakem görüşleri doğrultusunda düzeltilmek üzere yazar(lar)a gönderilen çalışmaların gerekli düzeltmeleri yapılarak yayın ofisine ulaştırılması gereklidir. Editörler tarafından belirtilen süre zarfında gönderilmeyen çalışmalar "ilk defa gönderilmiş çalışma" olarak değerlendirilecektir.

13. Yukarıdaki kurallara uygun olarak hazırlanmamış çalışmalar değerlendirmeye alınmaz.

## Guidelines to Authors

Akademik Gıda® (Academic Food Journal) is a peer reviewed journal where original research and review articles are published in the field of food science and technology. Research notes, mini-reviews, opinions and letters to the editor are also considered for publication. The journal is published trimonthly and each volume is composed of 4 issues per year. Journal articles are published either in Turkish or English. Manuscripts in either good American or British English usage are accepted, but not a mixture of these.

Manuscripts for the Akademik Gıda® (Academic Food Journal) must be sent via the electronic article submission system, which can be located in the official website of the journal, [www.academicfoodjournal.com](http://www.academicfoodjournal.com). Manuscripts sent by e-mail are not considered for evaluation. For questions related to the electronic article submission system, contact the editor via e-mail at [ogursoy@yahoo.com](mailto:ogursoy@yahoo.com).

- Authors must specify the type of the manuscript (research articles, review articles, research briefs, mini-review articles, comments and letters to the editor).
- Authors should provide at least 3 potential referees and their contact information (mailing address, e-mail address and phone number).
- Manuscripts to be submitted should be free from any spelling or grammatical error.
- Authors must guarantee that the submitted manuscript is not published anywhere previously and will not be submitted to anywhere before the editorial board makes a final decision on the manuscript.
- The editorial board is authorized to make necessary changes in manuscripts accepted for publication.

### Peer review policy

Manuscripts pass through initial screening in the editorial office followed by internal review by Editors. After the first evaluation, manuscripts are double-blind-reviewed by a peer review system involving at least two independent reviewers to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Editors have the right to decline formal review of a manuscript if it is (i) on a topic outside the scope of the Journal, (ii) lacking technical merit, (iii) fragmentary and providing marginally incremental results or (iv) poorly written.

### Publication fee

Akademik Gıda® (Academic Food Journal) welcomes article submissions and does not charge a publication fee.

### Ethics Statement

Detailed information about journal publication policy, evaluation of manuscripts and ethical issues can be found in the Ethics Statement section.

### Preparation of a manuscript

1. Manuscripts should be prepared in A4 size, and the text must be prepared in a single column format. The text must be double-spaced, and a single space should be left between paragraphs. All lines and pages must be continuously numbered.

2. The title must be 14pt Arial, bold, small letters and centered. A blank line should be left after the title, and the names of authors should be given in 10pt Arial and centered. In addition to each author's contact address, the phone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author should be provided. If the institutions of the authors are different, superscript numbers should be used to indicate their addresses.

3. The headings (e.g. Abstract, Introduction, Materials and Methods etc.) must be 10pt Arial, and should be typed in bold capital letters. Each heading should appear on its own separate line. A blank line should be left after each heading. A list of keywords, a maximum of 5, should be provided below the abstract section of the manuscript.

4. The main text should be prepared in 9.5pt Arial.

5. Typical articles mainly consist of the following divisions: Title, Author Names, Addresses, Contact Information, Corresponding author's e-mail address, Abstract, Main text (Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions), Acknowledgements (if necessary), Abbreviations (if necessary) and References.

6. The abstract should not exceed 250 words, and the main purpose and method and the most significant result and conclusion should be presented in the abstract. The abstract should be prepared as a single paragraph, and should not include any citation.

7. Latin names in the text should be in italics, and names and abbreviations should follow international rules. If abbreviations that are not standard are unavoidable, they must be defined at their first mention in the text. Consistency of abbreviations throughout the article must be ensured. Internationally accepted rules and conventions must be followed, and the international

system of units (SI) must be used. If other units are mentioned, their equivalents in SI must be provided.

**8.** Table headings should be on the top of each table and figure captions below each figure. Each table or figure must be numbered consecutively in accordance with their appearance in the text. All figures and tables should be cited in the text. The data presented in the tables and figures should not be repeated in the text. Table headings and figure captions should be self-explanatory. Figures and pictures must be provided in high resolution, and pictures (and, if necessary figures) should be included in the text as \*.jpg format.

**9.** References in the text should be cited in numbers in square brackets [1] and details of the citations must be provided in the Literature or References section with their respective numbers.

**10.** Mathematical equations should be numbered and cited in the text.

**11.** References should be given according to the APA manual of style. The following formats should be used for the details of cited references, and the journal names must be typed in italics. References to the Web addresses (if necessary, the official web pages should be preferred) must include full web address and the date of access.

#### **Article**

[1] Güzeler, N., Kaçar, A., Say, D. (2011). Effect of milk powder, maltodextrin and polydextrose use on

physical and sensory properties of low calorie ice cream during storage. *Akademik Gıda*, 9(2), 6-12.

#### **Book**

[2] Kilic, S. (2001). Lactic Acid Bacteria in Dairy Industry. Ege University Faculty of Agriculture Publications, Ege University Press, Bornova, Izmir, Turkey.

#### **Book Chapter**

[3] Gibson, G.R., Saavedra, J.M., MacFarlane, S., MacFarlane, G.T. (1997). Probiotics and Intestinal Infections. In Probiotics 2: Applications and Practical Aspects, Edited by R. Fuller, Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London, England, 212p.

#### **Proceedings of the Congress-Symposium**

[4] Gursoy, O., Akdemir, O., Hepbasli, A., Kinik, O. (2004). Recent situation of energy consumption in dairy industry in Turkey. *International Dairy Symposium: Recent Developments in Dairy Science and Technology*, May 24-28, 2004, Isparta, Turkey, Book of Proceedings, 10-16p.

**12.** A list of the corrections requested by the referees must be provided by the authors, and it must be sent to the editorial office.

**13.** Studies that are not prepared in accordance with the rules above will not be considered for evaluation.

## Etik Beyanı

Akademik GIDA®, gıda bilimi ve teknolojisi alanında orijinal araştırma ve derleme makalelerinin yayınlandığı hakemli bir dergidir. Dergi üç ayda bir Sidas Medya Ltd. Şti. (Çankaya, İzmir, Türkiye) tarafından yayınlanmaktadır. Derginin genel bilimsel kalitesini iyileştirmek için yayıncı tarafından aşağıdaki yönergeler belirlenmiştir.

### Yayın Politikası

Akademik Gıda dergisine gönderilen tüm makaleler Dergi Editörleri için Davranış Kuralları ve En İyi Uygulama Kılavuzları ve Dergi Yayıncıları için Davranış Kurallarında ([Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#)) belirtilen Genel Kılavuzlara uygun olarak değerlendirilmektedir. Bilimsel yazılar dergiye gönderilmeden önce derginin Yazım Kurallarının okunmasını önemle tavsiye ederiz. Yazarlar aynı zamanda Avrupa Bilim Editörleri Birliği'nin (EASE) ([European Association of Science Editors](#)) İngilizce olarak basılacak makaleler için "Bilimsel Makalelerin Yazarları ve Çevirmenleri İçin Rehber"e uymalıdır. Yazarlar, insan veya hayvan verilerini içeren araştırmaları için Uluslararası Tıp Dergisi Editörleri Komitesinin ([International Committee of Medical Journal Editors](#)) önerilerini takip etmelidir.

### Makalelerin Değerlendirilmesi

Dergiye gönderilen tüm makaleler, bilimsel içeriklerinin özgünlüğü ve kalitesi ölçütlerine göre değerlendirilir.

- Dergiye gönderilen tüm yazılar, ilk olarak yayın ofisindeki (teknik ve genel kalite değerlendirilmesi açısından) eleme işleminden geçer ve ardından teknik ve bilimsel editörler tarafından değerlendirilir.
- İlk değerlendirmeden sonra, editörler (i) dergi kapsamı dışında kalan bir konu hakkında hazırlanmış makaleleri (ii) teknik olarak eksik/yetersiz makaleleri, (iii) kısmi ve marjinal artan sonuçları içeren makaleleri veya (iv) kötü yazılmış makaleleri reddetme hakkına sahiptir.
- İlk inceleme sonucunda makalenin ileri değerlendirme için uygun olduğuna karar verilirse, dergide yayımlanmak üzere kaliteli makalelerin seçimini yapmak amacıyla, makaleler çift-körlü (hakemin ve yazar/yazarların birbirlerini görmedikleri) değerlendirme sistemi ile en az iki bağımsız hakemden oluşan bir değerlendirme sürecinde bilimsel incelemeye alınır.
- Hakemler tarafından talep edilirse, makalenin hakem görüşleri doğrultusunda yazarlar tarafından revize edilmiş versiyonu orijinal hakemler tarafından tekrar değerlendirilir. Değerlendirmelerin ardından

editörler hakem önerileri doğrultusunda makale hakkındaki nihai kararlarını verirler. Gerekirse editörler, hakemlerin istedikleri tüm şartların yerine getirilmesi için yazarlardan ilave revizyon isteyebilir.

- Kabul edilen makalelerin son versiyonu, yayın öncesi taslağın (galley proof) hazırlanması için teknik editörlere gönderilir. Yazarlardan, makalelerinin dizgisi hazırlanmış taslaklarını son kontrol için yayın öncesinde incelemeleri istenir.
- Tüm makaleler, nihai formlarında DOI numarası almış ve çevrimiçi olarak pdf dosyaları halinde yayımlanır. İlgili veritabanlarında bu şekilde indekslenir.

### Yayın Ücreti

Akademik Gıda dergisinde makalelerin yayınlanması için herhangi bir yayın ücreti talep edilmemektedir.

### Gizlilik

Editörler, Akademik Gıda'ya gönderilen tüm makaleleri tam bir gizlilikle ele alır. Editörler, hakemler haricinde, COPE tavsiyelerine uyulmadığı takdirde, üçüncü şahıslara makale ile ilgili hiçbir bilgi vermezler. Yayımlanmak üzere dergiye gönderilen makaleler hakemler için de gizlidir ve bilimsel değerlendirme için aldıkları makalelerin herhangi bir bölümünü üçüncü şahıslarla paylaşmalarına veya dağıtmalarına izin verilmez. Suiistimal şüphesi olduğunda, hakemlerin derhal gizli bir şekilde yayın ofisine başvurmaları önerilir. Hakemler ayrıca, Dergi Editörleri için Davranış Kuralları ve En İyi Uygulama Kuralları ile Dergi Yayıncıları için Davranış Kuralları'nı ([Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#)) takip ederek editöre gizli yorumlarında belirli bir eylem önerebilirler.

Akademik Gıda, çift-kör bir hakem inceleme süreci yürütür, yani çalışmanın eleştirel değerlendirmesini sağlamak için hakemlerin isimleri gizlidir. Hakemlerden, raporlarında adlarını veya irtibat bilgilerini açıklamamaları istenir. Hakem raporları yazarlara gönderilemeden önce bu açıdan kontrol edilir.

### Yazarlık

Bir yazar, bir araştırmanın fikrine veya tasarımına, verilerin elde edilmesine, verilerin analizine veya yorumlanmasına büyük ölçüde katkıda bulunan, makalenin hazırlanmasında, yazılmasında veya gözden geçirilmesinde entelektüel içeriğe eleştirel katkı yapan bireydir. Katkıda bulunanlar diğer kişiler makalenin Teşekkür bölümünde belirtilmelidir ve çalışmanın yazarı olarak kabul edilemez. Tüm yazarların doğru ve tam isimleri ile ORCID kimlikleri dergiye gönderilen

makalenin başlık sayfasında yer almalıdır. Yazarların isimlerinin yanında çalıştıkları kurumlar ve yazışmalardan sorumlu yazarın geçerli bir adresi verilmelidir. Yazışmalardan sorumlu yazarın telefon ve faks numaraları ile e-posta adresi makalenin ilk sayfasında belirtilmelidir. Tüm yazarlar, gönderilen makalenin daha önce herhangi bir yerde yayınlanmadığını ve makale hakkında Akademik Gıda dergisi nihai bir karar vermeden önce makaleyi başka bir dergiye göndermeyeceklerini garanti etmelidir.

### Destekleyen/Finans Sağlayan Kuruluşlar

Araştırmanın tüm finans kaynaklarına ilişkin detaylar, Teşekkür bölümünde belirtilmelidir. Yazarlar, resmi finansman kurum/larının tam isimlerini ve proje/hibe numaralarını belirtmelidir.

### Yazarlarda Değişiklik

Makalenin Akademik Gıda'ya sunulmasından sonra yazar isimlerinde değişiklik ancak revizyon sırasında gerekli olan ek çalışmalar durumunda olabilir. Makalenin yayına kabul edilmesinden sonra herhangi bir değişikliğe izin verilmez. Yazarlıktaki değişiklik, hakem görüşlerine verilen cevaplar sırasında yazışmalarda belirtilmeli ve tüm yazarlar tarafından kabul edilmelidir. Yazışmalardan sorumlu yazar, yazarların sırası da dahil olmak üzere makalenin revize edilmiş versiyonundaki değişikliklerden sorumludur.

### Çalışma Verilerinde Düzeltme

Yayınlanan verilerin doğruluğundan tüm yazarlar sorumlu olmalıdır. Verilerin düzeltilmesi için, yazışmalardan sorumlu yazardan yayın öncesi taslağı (galley proof) incelemesi ve makalenin yayınlanmasından 4 gün önce dikkatlice düzeltilmesi istenir.

### Makalenin Geri Çekilmesi

Bir makalenin geri çekilmesi, gönderim veya yayın hatalarını düzeltmek için kullanılır. Yazarlar makaleyi geri çekebilir ve bu durumda Yayın Etiği Komitesi (COPE) Geri Çekme Kurallarına [(COPE) retraction guidelines] uymalıdır. Tekrarlanan veya benzerlik oranı yüksek bir yayın, verilerin hileli kullanımı, intihal veya etik dışı araştırma yapılması durumunda, makale editör tarafından geri çekilecek ve geri çekilen makale linklerine bağlantı korunacak ancak elektronik veri tabanına (makale sayfasına) bir geri çekme bildirimi eklenecektir.

### Etik Hususlar

#### Çıkar çatışması:

- Yazar/lar başvuru sırasında herhangi bir çıkar çatışması varsa beyan etmelidir. Yazar/ların başvuru sırasında bilimsel değerlendirme için en az üç potansiyel hakem önermeleri istenir. Önerilen hakemler çalışma arkadaşları, ortak çalıştıkları kişiler veya çalıştıkları kurumların üyeleri olamazlar.
- Hakemler makaleyi değerlendirmelerini önleyen herhangi bir çıkar çatışması olması durumunda

Editörleri bilgilendirmesi ve bu konuda COPE kurallarına uyması tavsiye edilmektedir.

- Editörler Kurulu üyeleri veya kurul üyelerinin ortak çalıştıkları kişiler tarafından dergiye gönderilen makaleler için, değerlendirme sırasındaki önyargıları en aza indirmek amacıyla, değerlendirme süreci ilgili kurul üyelerini dışarıda tutacak şekilde değiştirilerek uygulanır.
- Düzeltmeler (revizyonlar) sırasında, editörler Dergi Editörleri İçin Davranış Kuralları ile En İyi Uygulama Kılavuzu ve Dergi Yayıncıları İçin Davranış Kurallarını (Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers) takip ederler.

### İnsan denekleri, hayvan veya bitki içeren araştırmalar

- Araştırmanın insan denekleri veya hayvanları içermesi durumunda, yazarların Uluslararası Tıp Dergisi Editörleri Komitesinin (the International Committee of Medical Journal Editors) yönergelerini izlemeleri önerilir.
- İnsan denekleri içeren çalışmalarda, deneklerin çalışmaya katılmak için imzaladıkları onamlar yazarlar tarafından sağlanmalıdır. 18 yaşın altındaki deneklerin çalışmaya katılmaları için ebeveyn veya velileri tarafından izin verilmelidir.
- Test edilen tüm denekler için, makalenin, ilgili kurallara ve/veya uygun izinlere veya lisanslara uyumunu gösteren belgelerin sunulması gerekir.
- Hayvanlar üzerinde yapılacak her türlü araştırma kurumsal, ulusal veya uluslararası kurallara uygun olmalı ve etik kurul tarafından onaylanmalıdır.
- Bitki materyallerinin toplanması dahil, bitkiler üzerinde yapılan deneysel araştırmalar, kurumsal, ulusal veya uluslararası kurallara uygun olmalıdır.
- Saha çalışmalarını yerel mevzuata uygun olarak yapılmalı ve uygun izinleri ve/veya lisansları belirten bir açıklama makalede yer almalıdır.

### Yayın suistimali

- Akademik Gıda dergisi, Dergi Editörleri İçin Davranış Kuralları ile En İyi Uygulama Kılavuzları ve Dergi Yayıncıları İçin Davranış Kurallarını (Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers) takip eder.
- Makalenin aynı anda birden fazla dergiye gönderilmesi, intihal, yayınlanmış makalenin yeniden yayınlanması, etik kuralların ihlali vb. şüpheli bir suistimal durumunda, araştırmacılar, hakemler veya okuyucular Yayın Ofisi (ogursoy@yahoo.com) ile iletişime geçmeye teşvik edilir.
- Makaledeki benzerlik oranı tek bir kaynaktan %10'dan fazla olmamak üzere en fazla %25 ile sınırlandırılmıştır. Bu koşula uymayan makaleler reddedilir. Bu şartların ihlal edilmesi durumunda, COPE (COPE recommendations) tavsiyeleri izlenecek ve ilgili tüm taraflara bildirilecektir.

## Telif Hakkı

Akademik Gıda, yayınlanan bütün makalelere orijinal eserin uygun şekilde belirtilmesi ve ticari amaçlarla kullanılmaması şartıyla, herhangi bir ortamda kullanılmasına, dağıtılmasına ve çoğaltılmasına izin veren "Creative Commons Attribution 4.0 CC BY-NC" lisansını ([Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 CC BY-NC](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)) tüm yayınlanmış makalelere uygular. Yayınlanmadan önce, Telif Hakkı Devir Formu yazışmalardan sorumlu yazar tarafından imzalanmalı ve derginin yayın ofisine gönderilmelidir. Yayınlanan yazıların telif hakkı Sidas Medya Limited Şirketi'ne (Çankaya, İzmir) aittir. Yazarlar, yayınladıkları makaleleri serbestçe ve ticari olmayan amaçlarla, bütünlüğü korunduğu ve yazarları, alıntı detaylarını ve yayıncıları açıkça belirtildiği sürece kullanma hakkına

sahiptir. Bireysel kullanıcılar, yazarların fikri ve ahlaki haklarının, saygınlığının ve bütünlüğünün tehlikeye atılmaması şartıyla, Akademik Gıda'da yayınlanan yazılara erişebilir, indirebilir, kopyalayabilir, görüntüleyebilir ve uyarlayabilir. Kullanıcılar herhangi bir yeniden kullanımın, sahiplerin telif hakkı politikalarına uygun olmasını sağlamalıdır. Yayınlanan yazıların içeriği, ticari olmayan araştırma ve eğitim amaçlı kopyalanır, indirilir veya başka bir şekilde yeniden kullanılırsa, uygun şekilde bir atıf yapılmalı ve ilgili makaleye bir link [yazarlar, dergi unvanı, el yazması adı, cilt, yıl ve sayfa numaraları ve yayınlanan link] Derginin web sitesinde sürüm] sağlanmalıdır. Telif hakkı bildirimleri ve feragatnameler silinmemelidir.



## Ethics and Publication Malpractice Statement

Akademik GIDA® is a peer-reviewed journal where original research and review articles are published quarterly by Sidas Media Agency Advertisement Consultation Ltd. (Cankaya, Izmir, Turkey) in the field of food science and technology. In order to improve the overall scientific quality of the journal, following guidelines have been established by the publisher.

### Editorial Policy

General Guidelines stated in the [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#) are followed by all papers submitted to Academic GIDA. Prior to submission, authors are highly recommended to read the [Journal's Instructions to Authors](#). Authors should also follow the [European Association of Science Editors \(EASE\) Guidelines for Authors and Translators of Scientific Articles to be Published in English](#). For any research involving human or animal data, the recommendations of the [International Committee of Medical Journal Editors](#) should be followed by the authors of the manuscripts.

### Peer Review

All contributions are evaluated according to the criteria of originality and quality of their scientific content.

- All manuscripts pass through an initial screening process (technical and overall quality evaluation) in the editorial office followed by an internal review by the technical and scientific editors.
- After the first evaluation, editors have the right to decline formal review of a manuscript if it is (i) on a topic outside the scope of the Journal, (ii) lacking technical merit, (iii) fragmentary and providing marginally incremental results or (iv) poorly written.
- If the manuscript is considered suitable for further evaluation, manuscripts are double-blind-reviewed by a peer review system involving at least two independent reviewers to ensure high quality of manuscripts accepted for publication.
- If requested, the revised version is evaluated by the reviewers, and editors make a decision about final acceptance based on their suggestions. If necessary, further revision can be asked for to fulfil all the requirements of the reviewers.
- The final version is then sent to the technical editor in order to produce a galley proof, and the authors receive this proof for final check before publishing.
- All manuscripts are posted online as pdf files in their final form, indexed in databases with the assigned DOI numbers.

### Publication Fee

Akademik GIDA welcomes article submissions and does not charge any publication fee.

### Confidentiality

Editors handle all papers submitted to Akademik GIDA in strict confidence. With the exception of reviewers, they do not disclose any information regarding submissions to third parties, unless in case of a suspected misconduct, where COPE recommendations are followed. Submissions are also confidential for reviewers and they are not allowed to share or distribute any part of the manuscripts which they receive for evaluation to third parties. For a case of suspected misconduct, reviewers are encouraged to contact the editorial office immediately in a confidential manner. Reviewers can also recommend a particular course of action in their confidential comments to the editor, following [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#).

Akademik GIDA conducts a double-blind peer review process, i.e. the names of the reviewers are confidential to ensure the critical evaluation of the work. Reviewers are asked not to disclose their names or contact details in their comments for authors.

### Authorship

An author is an individual who substantially contributed to the idea or design of a research, acquisition of data, analysis or interpretation of data, was involved in drafting, writing or revising the manuscript critically for important intellectual content. Other contributors should be mentioned in the Acknowledgements section of the manuscript and cannot be considered as authors of the study. Correct and full names of all authors and their [ORCID](#) IDs should be on the title page of the manuscript. Names of authors must be supplemented with their affiliations and a valid address of the corresponding author. The phone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author should be stated in the first page of the manuscript. All authors must guarantee that the submitted manuscript is not published anywhere previously and will not be submitted to anywhere before the editorial board makes a final decision on the manuscript.

### Funding Sources

Details for all funding sources of the research should be stated in the Acknowledgements. Authors should provide

the full official funding agency name(s) and grant number(s).

### **Alteration in Authorship**

Alteration in authorship after the submission of the manuscript to Akademik GIDA can be justified only by the additional work required during the revision. Any change is not allowed after the acceptance of the manuscript for publication. Alteration in authorship should be indicated in the responses to reviewers, and should be accepted by all authors. The corresponding author is primarily responsible for any alteration in the revised version of the manuscript, including the order of authors.

### **Correction of Data**

All authors should be responsible for the accuracy of the published data. For the correction of data, the corresponding author receives the galley proof of the paper and is asked to correct it carefully within 4 days before publication.

### **Retraction of an Article**

A retraction of an article is used to correct errors in submission or publication. Authors can retract the paper and should follow the Committee on Publication Ethics (COPE) [retraction guidelines](#). In case of a duplicate or overlapping publication, fraudulent use of data, plagiarism or unethical research, the paper will be retracted by the editor, and a retraction notice will be included into the electronic database while all links to the retracted article will be maintained.

### **Ethical Considerations**

#### ***Conflict of interest:***

- Authors should declare any conflict of interest in their submission form. Authors are requested to suggest at least three potential reviewers before submission, and these reviewers cannot be their colleagues, collaborators or members of their institutions.
- Reviewers should notify the editors on any conflict of interest which prevents them from reviewing the paper, and they are recommended to follow the [COPE guidelines](#).
- For the manuscripts submitted by the members of the Editorial Board or their collaborators, peer reviewing is modified to exclude them from the entire evaluation process in order to minimize any bias during the evaluation.
- During revision, the editors follow the [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#).

#### ***Research involving human subjects, animals or plants:***

- If the research involves humans or animals, the authors are recommended to follow the guidelines of the [International Committee of Medical Journal Editors](#).

- In studies involving human subjects, their informed consent to participate in the study should be supplied by the authors. For subjects under the age of 18, their parents or guardians should give the permission for their participation in the study. For all tested subjects, the manuscript must accompany with a statement detailing compliance with relevant guidelines and/or appropriate permissions or licenses.
- Any research on animals must comply with institutional, national or international guidelines and, where possible, should be approved by an ethics committee.
- Any experimental research on plants, including collection of plant materials, must comply with institutional, national, or international guidelines.
- Field studies should be conducted in compliance with local legislation, and a statement specifying the appropriate permissions and/or licences should be included in the manuscript.

#### ***Publication misconduct:***

- The Journal follows the [Code of Conduct and Best Practice Guidelines for Journal Editors and Code of Conduct for Journal Publishers](#).
- In a case of a suspected misconduct such as redundant or duplicate submission, plagiarism, text recycling, violation of ethical norms, etc., researchers, reviewers or readers are encouraged to contact the Editorial Office ([ogursoy@yahoo.com](mailto:ogursoy@yahoo.com)).
- The overlapping in the manuscript is highly restricted to the maximum of 25% with no more than 10% from a single source; otherwise, the manuscript will be rejected. If these terms are violated, COPE recommendations will be followed and all parties involved will be notified.

### **Copyright**

Akademik GIDA applies the [Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 CC BY-NC license](#) to all published papers, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. Before publication, the [Copyright Transfer Form](#) must be signed by the corresponding author and returned to the editorial office of the journal. Copyright of published papers is retained by the Sidas Media Agency Advertisement Consultation Ltd. (Cankaya, Izmir, Turkey). Authors have the right to use their published article freely and in noncommercial purposes, as long as its integrity is maintained and its original authors, citation details and publisher are clearly stated. Individual users may access, download, copy, display, and adapt the manuscripts published in Akademik GIDA, provided that the authors' intellectual and moral rights, reputation and integrity are not compromised. Users must ensure that any reuse complies with the copyright policies of the owners. If the content of the published manuscripts is copied, downloaded or otherwise reused for noncommercial research and educational purposes, a link to the appropriate bibliographic citation (authors, journal title, manuscript title, volume, year and page

numbers, and the link to the published version on the [Journal's website](#) should be provided. Copyright notices and disclaimers must not be deleted.

---

Fevzipaşa Blv. Çelik İş Merkezi No:162 K:3 D:302 Çankaya / İZMİR  
Tel: +90 232 441 60 01 Fax: +90 232 441 61 06 E-mail: [sidasmedya@gmail.com](mailto:sidasmedya@gmail.com)

**SIDAS MEDYA**