

# GIDA

*THE JOURNAL OF FOOD*



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 48

SAYI / NUMBER : 3

YIL / YEAR : 2023

**GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI**

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF  
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

**Sahibi / Owner**

Gıda Teknolojisi Derneği Adına / On behalf of the Association of Food Technology; Turkey

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

**Baş Editör/ Editor-in Chief**

ÇAKIR, İbrahim; *Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey*

**Editörler / Editors**

AVCI, Ayşe; *Sakarya University, Turkey*  
ÇOLAKOĞLU, A. Sinan; *Kabramanmaraş Sütcü İmam University, Turkey*  
DEMİRKESEN, Mert; *İlkem, Ministry of Agriculture and Forestry, Turkey*  
DEMİROK SONCU, Eda; *Ankara University, Turkey*  
ERİNÇ, Hakan; *Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey*  
EYİLER, Esen; *Akdeniz University, Turkey*  
KULEAŞAN, Şükran; *Mehmet Akif University, Turkey*  
TABAN, Birce; *Ankara University, Turkey*  
TORUN, Mehmet; *Akdeniz University, Turkey*  
ÖZDEN, Özkan; *İstanbul University, Turkey*  
YILMAZ, Merve Sılanır; *Bitlis Eren University, Turkey*

**Yönetim Yeri**

**Adres / Address**

Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey

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

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

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

**Yayın Türü:** Yaygın süreli ve hakemli

**Hazırlayan / Prepared**

Sim Ajans  
19. Sokak No: 47/1 Emek / Ankara  
Tel : (+90) 312 925 25 95  
e-mail: simajans@simajans.com

**Yayın Tarihi / Publication Date**

15 06 2023

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Akköse, Ahmet; *Atatürk University, Turkey*  
Ank, Gökşen G.; *Balıkesir University, Turkey*  
Atalar, İlyas; *Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey*  
Baysal, A. Handan; *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Turkey*  
Bezirtzoglou, Eugenia; *Democritus University of Thrace, Greece*  
Bozkur, Hamza; *Sakarya Uygulamalı Bilimler University, Turkey*  
Çilak, Gizem Ö.; *Hitit University, Turkey*  
Draughton, Ann Tennessee University, USA  
El Soda, Morsi University of Alexandria, Egypt  
Erbay, Zafer; *Adana Bilim ve Teknik University, Turkey*  
Evren, Mustafa; *Ondokuz Mayıs University, Turkey*  
Fogliano, Vincenzo University of Napoli Federico II, Italy  
Gerçekaslan, K. Emre; *Neşehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey*  
Ghosh, Bikash C. National Dairy Research Institute, India  
Gollop, Natan The Volcani Center, ARO, Israel  
Griffiths, Mansel University of Guelph, Canada  
Güneşer, Onur; *Uşak University, Turkey*  
Güven, Esra Ç.; *İstanbul Teknik University, Turkey*  
Ho, Chi-Tang The State University of New Jersey, USA  
Hoşoğlu, Müge İ.; *Gebze Teknik University, Turkey*  
Hüner, İrem D.; *Trakya University, Turkey*  
Kahraman, Kevser; *Abdullah Gül University, Turkey*  
Karaca, Hakan; *Pamukkale University, Turkey*  
Koçan, Deniz; *Aksaray University, Turkey*  
Konuskan, Dilşat B.; *Mustafa Kemal University, Turkey*  
Kuleaşan, Hakan; *Süleyman Demirel University, Turkey*  
Meral, Raciye; *Yüzüncü Yıl University, Turkey*  
Mete, Aylin A.; *Mersin University, Turkey*  
Morales, Francisco J. CSIC Instituto del Fr o, Spain  
Muhtaba, Mustafa G. Florida Gulf Coast University, USA  
Mutlu, Türkan K.; *Çukurova University, Turkey*  
Öztürk, Fatma; *Kâtip Çelebi University, Turkey*  
Paalme, Toomas Tallinn University of Technology, Estonia  
Parlar, Harun Technical University of Munich, Germany  
Raspor, Peter University of Primorska, Slovenia  
Rezessy-Szabo, Judit M. Corvinus University of Budapest, Hungary  
Sarı, Ferda; *Cumhuriyet University, Turkey*  
Şengün, İlkin Y.; *Ege University, Turkey*  
Soyer, Yeşim; *Orta Doğu Teknik University, Turkey*  
Toğay, Sine Ö.; *Bursa Uludağ University, Turkey*  
Toker, Ömer S.; *Yıldız Teknik University, Turkey*  
Velioglu, Murat; *Namık Kemal University, Turkey*  
Yemiş, Gökçe P.; *Sakarya University, Turkey*  
Yolaçaner, Elif; *Hacettepe University, Turkey*  
Yorulmaz, Aslı; *Adnan Menderes University, Turkey*  
Zorba, Murat; *Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey*

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

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

# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

Ertürkmen, P., Öner, Z. (2023). *Determination of endospore structure and volatile compounds of clostridial species during sporulation / Geç şişme etmeni clostridial türlerin sporulasyon süresince endospor yapısı ve uçucu bileşiklerinin belirlenmesi* . . . . . **499-508**

Uzun, P., Özünal, A. E., Ayabakan, M., Başkaya, H., Doğan, N., Gülay, S. M., Hantal, B., Üner, M., Barla Demirkoz A. B. (2022). *Investigation of flavour permanence of strawberry and watermelon flavoured chewing gums by using retronasal aroma trapping device and sensory analysis techniques / Çilek ve karpuz aromalı sakızlarda aroma kalıcılığının retronazal aroma-yakalama cihazı ve duyuşsal analiz teknikleri kullanılarak araştırılması* . . . . . **408-419** Erratum / Düzetme

Karacan, E., Özdikicierler, O., Yemişcioğlu, F. (2023). *Comparative investigation of the use of Sterol composition, ECN42 difference and FTIR spectroscopy in the determination of virgin olive oil adulteration / Natürel zeytinyağı tağşişinin tespitinde sterol kompozisyonu, ECN42 farkı ve FTIR spektroskopisinin kullanımının karşılaştırmalı olarak incelenmesi* . . . . . **510-525**

Dündar, A. N., Şahin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2023). *Low-fat cookies with *Chlorella vulgaris*: effects on dough rheology, physical, textural and sensory properties of cookies / *Chlorella vulgaris* içeren az yağlı kurabiyeler: Hamur reolojisi, fiziksel, dokusal ve duyuşsal özellikler üzerine etkileri* . . . . . **526-544**

Şensu, E., Duran, A., Özçelik, B., Yücepete, A. (2023). *Investigation of changes in some bioactive properties of phenolic extracts from pulp and seed tissues of *Ziziphus jujuba* during in vitro digestion / *Ziziphus jujuba* hünnap iç ve çekirdek dokularından fenoliklerin in vitro sindirim sırasında bazı biyoaktif özelliklerindeki değişimin araştırılması* . . . . . **602-613**

Yılmaz, E., Yücepete, E. (2023). *Screening the alkali-neutralized sunflower seed oil bleaching ability of some natural and acid-activated natural clays, synthetic adsorbents, and metal-organic frameworks / Bazı natural ve asit-aktif natural killerin, sentetik adsorbanların ve metal-organik çerçevelerin alkali-nötralize ayçiçeği yağı ağartma yeteneklerinin incelenmesi* . . . . . **653-669**

Şanlı T. (2023). *Investigation of utilizing whey in dairy-based dessert formulations with carob powder / Keçi boynuzu tozu içeren süt esaslı tatlı formülasyonlarında peyniraltı suyu kullanımının araştırılması* . . . . . **670-681**

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

Baysan, U., Koç, M., Güngör, A., Kaymak Ertekin, F. (2023). *2-fazlı pirininin ön kurutulmasının gerekliliği ve valsli kurutucu kullanımı / The necessity of pre-drying 2-phase olive pomace and the usage of drum dryer* . . . . . **562-574**

Balki, V. M., Demirel Zorba, N. N., Çakıcı, N. (2023). *Yeşil sebzelerde genişlemiş spektrumlu beta- laktamaz ve karbapenemaz üreten *Enterobacteriales* suşlarının araştırılması / Investigation of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing *Enterobacteriales* strains in green vegetables* . . . . . **575-586**

Toplu, B., Sıçramaz, H., Ayhan, Z. (2023). *Farklı ambalaj materyalleri ve vakum/modifiye atmosfer ambalajlamanın dilimlenmiş Hatay peynirinin kalitesi ve raf ömrüne etkisi / The effects of different packaging materials and vacuum/modified atmosphere packaging methods on the quality and shelf life of sliced Hatay cheese* . . . . . **587-601**

Mutlu, C., Korkmaz, F. (2023). *Ultrasonikasyon ve soksalet yöntemleriyle ekstrakte edilen ketencik tohum yağlarının oksidatif özelliklerinin belirlenmesi / Determination of the oxidation properties of camelina seed oils extracted by ultrasonication and Soxhlet methods* . . . . . **627-640**

Şanlı, Y., Coşkun, H. (2023). *Düzce'de yetiştirilen Anadolu ırkı manda sütlerinde laktasyon boyunca meydana gelen değişimler / Changes in the milk of Anatolian buffalo raised in Düzce during lactation period* . . . . . **641-652**

## Derlemeler (Türkçe) / Reviews (Turkish)

İşgüzar, E. E., Fincan, M. (2023). *Şeker ekstraksiyonunda vurgulu elektrik alan uygulama potansiyelinin değerlendirilmesi / Potential use of pulsed electric fields in sugar extraction* . . . . . **545-561**

Zadeh, J. H., Pazır, F. (2023). *Investigation of the potential applications of cold plasma technology in food safety / Soğuk plazma teknolojisinin gıda güvenliği alanındaki potansiyel uygulamalarının araştırılması* . . . . . **614-626**



## DETERMINATION OF ENDOSPORE STRUCTURE AND VOLATILE COMPOUNDS OF CLOSTRIDIAL SPECIES DURING SPORULATION

Pelin Ertürkmen<sup>\*1</sup>, Zübeyde Öner<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur Food, Agriculture and Livestock Vocational School, Department of Food Processing, Burdur, Türkiye

<sup>2</sup>Suleyman Demirel University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Isparta, Türkiye

Received /Geliş: 04.02.2023; Accepted / Kabul: 27.03.2023; Published online / Online baskı: 03.04.2023

Ertürkmen, P., Öner, Z. (2023). Determination of endospore structure and volatile compounds of clostridial species during sporulation. GIDA (2023) 48 (3) 499-508 doi: 10.15237/gida.GD23028

Ertürkmen, P., Öner, Z. (2023). Geç şişme etmeni clostridial türlerin sporulasyon süresince endospor yapısı ve uçucu bileşiklerinin belirlenmesi. GIDA (2023) 48 (3) 499-508 doi: 10.15237/gida.GD23028

### ABSTRACT

In this study, endospore structural and volatile compounds of clostridial species causing late blowing defect (LBD) in cheese were investigated during sporulation. The species were morphologically identified by Gram staining, catalase and oxidase tests, and anaerobic growth tests, and were confirmed by 16S rRNA gene sequence analysis. Strains with high gas production capacity were analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) during sporulation. At the end of sporulation, alcohols such as butanol, pentanol, ethanol, hexanol, propanol, octanol, as well as sulfite, ester and acid group compounds were the prominent components. The cell wall residues and endospore structural components of *Clostridium sporogenes* strains with a total relative percentage area of >50% sulfite group compound were observed more intensively than *Clostridium butyricum* strains with high butanol production levels. The information obtained from this study will facilitate studies aimed at identifying endospore structural and volatile compounds of LBD clostridial species.

**Keywords:** *Clostridium* spp., GC-MS, SEM, late blowing, 16S rRNA

## GEÇ ŞİŞME ETMENİ CLOSTRİDİAL TÜRLERİN SPORULASYON SÜRESİNCE ENDOSPOR YAPISAL VE UÇUCU BİLEŞİKLERİNİN BELİRLENMESİ

### ÖZ

Bu çalışmada, çeşitli örneklerden izole edilen ve peynirde geç şişme kusuruna neden olan clostridial türlerin sporulasyon süresince endospor yapısal ve uçucu bileşikleri araştırılmıştır. Gram boyama, katalaz ve oksidaz testi, anaerobik gelişim testleri ile morfolojik olarak tanımlanan türler 16S rRNA gen sekans analizi ile doğrulanmıştır. Sporulasyon süresince, yüksek gaz üretim kapasitesine sahip suşlar Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile analiz edilmiştir. Sporulasyon sonunda bütanol, pentanol, etanol, hexanol, propanol, oktanol gibi alkol bileşikleri; sülfid, ester ve asit grubu bileşikler öne çıkan bileşenlerdendir. Toplam bağıl yüzde alanı >%50 sülfid grubu bileşiğe sahip olan *Clostridium sporogenes* suşlarının hücre duvarı kalıntıları ve endospor yapısal bileşenleri; bütanol üretim düzeyi yüksek olan *Clostridium butyricum* suşlarına göre

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar:

✉: perturkmen@mehmetakif.edu.tr

☎: (+90) 248 213 2278

Pelin Ertürkmen; ORCID ID: 0000-0003-4321-7886

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



daha yoğun şekilde gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler geç şişme etmeni clostridial türlerin endospor yapısal ve uçucu bileşiklerinin tespitine yönelik çalışmalara kolaylık sağlayacaktır.

**Anahtar kelimeler:** *Clostridium* spp., GC-MS, SEM, geç şişme, 16S rRNA

## INTRODUCTION

*Clostridium* spp. are predominantly obligate anaerobic, Gram-positive, long rod-shaped bacteria that form endospores both in vivo and in vitro, with some being aerotolerant. They are catalase and peroxidase negative, most are mesophilic, except for *C. perfringens*, which is non-capsulated, motile with peritrichous flagella, and have a size of 4-6  $\mu\text{m}$ -1  $\mu\text{m}$  (Quinn et al., 2004; Keto-Timonen et al., 2006). *Clostridium* species are the only group of microorganisms that can undergo acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation, which they can do by various means during milk processing. Gas chromatography can be used to determine volatile carboxylic acids, providing information about ABE fermentation in case of doubt (Jakob, 2011). ABE fermentation consists of two phases, acidogenic and solventogenic. In the acidogenic phase, organic acids are produced, which are then converted to acetone and butanol in the solventogenic phase (Lee et al., 2008). In the solventogenic phase, the pH increases due to solvent formation, and the bacteria lose their ability to reproduce and form endospores (Qureshi and Ezeji, 2008). During cheese processing, endospores that survive thermal treatments of milk can transform into a vegetative form in cheese, fermenting sugars and producing acetic acid, butyric acid, carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) and hydrogen ( $\text{H}_2$ ) gas (Matijasic et al., 2007; Gómez-Torres et al., 2014). In particular, the low solubility of  $\text{H}_2$  gas leads to gas accumulation and explosions during cheese maturation, causing large pores, cracks, and fissures to form, followed by late blowing problems, and the production of bad odor and flavor (McSweeney, 2007; López-Enríquez et al., 2007; D'Incecco et al., 2018). The most important four bacterial species that cause late blowing in milk and cheese are *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* and *C. tyrobutyricum* (Julien et al., 2008; Garde et al., 2011).

Although various methods are used for the species-level identification of late blowing defect (LBD), errors can occur in the identification of

isolates in some cases. Accurate identification is essential for determining which species are present in the sample under investigation, the reactions they cause, and for removing or monitoring the bacteria from the environment. PCR-based methods that identify the 16S rRNA region are commonly used molecular methods for the species-level identification of *Clostridium* spp. (Bassi et al., 2013; Chean et al., 2014; Turci et al., 2016).

The identification of clostridial species responsible for gas production and the determination of the structural compounds of endospores during sporulation are essential for preventing late blowing problems. For this purpose, scanning electron microscopy (SEM) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used together to analyze the endospore structural and volatile compounds of clostridial strains that were safely identified using PCR during sporulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Clostridial strains and store conditions

17 clostridial strains isolated from Kashar cheese, milk and silage samples with phenotypic descriptions such as Gram-endospore staining, catalase-oxidase and mobility test by Ertürkmen and Öner (2023) which were used as material in this study. The strains were inoculated into the Bryant Burkey Broth with Resazurine and Lactate (BBB, Merck, Germany) and covered with 2 cm of sterile paraffin and incubated at 37 °C for 3 days by an anaerobic kit (Anaerocult A Merck 1.16275) under anaerobic conditions.

### Identification of isolates by the 16S rRNA gene sequence

Genomic DNA extraction from pure liquid culture was performed by the GeneMATRIX Bacterial & Yeast Genomic DNA isolation kit (EURx Ltd., Polonia) following the manufacturer's instructions with an initial sample preparation protocol. Concentration and quality of DNA samples were measured by Nanodrop

2000 (Thermo Scientific, USA). 16S rRNA gene region was amplified with the universal primers 27F and 1492R (Lane 1991). For setting up PCR reactions were performed using a PCR Kyratec Thermal Cycler (Australia) and PCR Master Mix (5 x FIREPol® Master MixSolis BioDyne, Estonia). Each 35 µL of PCR reaction contained 3 µL of DNA template, 20 mM deoxynucleotide triphosphate, 10 mM primer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, and 5 U of Taq DNA Polymerase (Solis Biodyne (Estonia) FIREPol® DNA Polymerase). The PCR program was 95 °C, 5 min; 35 cycles: 95 °C, 45 s; 57 °C, 45 s; 72 °C, 60 s; and a final extension at 72 °C for 5 min. A 10-µL aliquot of the PCR products from each reaction was electrophoresed in 1.5% agarose gel. Gel images were visualised using a Gel Viewing System (Vilber Lourmat, France). Used BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Macrogen Holland Laboratory) and ABI 3730XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California) to sequence the PCR products (forward and reverse primer). The generated sequences were compared with those present in the GenBank database, using BLAST sequence similarity searching [https:// blast.ncbi.nlm.nih.gov/ blast.cgi; ribosomal RNA sequences (bacteria)].

#### Scanning electron microscopy

SEM was used to observe the morphology of endospore structures during the sporulation process. These samples were incubated anaerobically in BBB at 37 °C for 3 and 7 days. Cells washed two times in phosphate buffered saline solution and were centrifuged at 4 °C for 10 min each time. Observations were made using the gold-plated technique under low vacuum conditions. Images of the samples were taken using QUANTA 250 FEG scanning electron microscope at the Energy Technologies Research Unit Center (ETRUC) of the Suleyman Demirel University.

#### The ability of clostridial isolates to produce volatile compounds

Clostridial isolates were inoculated into BBB for gas capacity testing. Inoculated tubes were sealed with sterile paraffin and incubated at 37 °C for 7 days. Strains were analyzed for volatile

compounds by GC-MS (Model; QP 2010 ultra-series, Shimadzu, Tokyo, Japan). Volatile compounds were extracted by automated solid-phase microextraction (SPME, Supelco, Germany). A 5 mL amount of liquid culture was placed in an amber headspace vial and sealed with a PTFE coated silicone septum (Supelco, Bellefonte, PA) that was placed on an autosampler tray and subjected to solid-phase microextraction. The equilibration and extraction phases were carried out at 45 °C for 15 minutes. Carboxen-Polydimethylsiloxane (CAR/ PDMS) coated fiber (Supelco, Bellefonte, PA) was used for headspace extraction. Chromatographic separation was carried out in a column (Restek Rx-5 Sil MS 30 m × 0.25 mm, 0.25 µm) with a helium flow of 1 mL/min. Relative abundances of compounds were expressed as percentages of their peak areas over the peak area of the internal standard cyclohexanone.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Identification results of *Clostridium* spp.

The identification of 17 *Clostridium* spp. strains at the species level and the similarity rates ranging from 99-100% are presented in Table 1. After PCR reaction, agarose gel electrophoresis was performed on the DNA samples, and it was observed that the *Clostridium* strains formed a single pattern of approximately 1500 bp in size with reliable bands (Figure 1).

The results showed that sixteen bacterial isolates were found to be the genus *Clostridium* supported an identification of *C. sporogenes* using BLAST analysis and identical (100%) match with a *C. sporogenes* (*n*:11) MF062498.1 and MT356160.1 with 100% and 99.56% of sequence homology and with other *C. sporogenes* (*n*:1) LC153544.1 with 99.71% of homology identify 16S rRNA sequences in the GenBanks database, correctly. CL81, CL99 and CL105 were identified as *C. butyricum* strain MT510294.1 with 99.17% and 100% of homology respectively and one isolate did not result in a species level match either. In the study conducted by Cremonesi et al. (2012), the authors identified *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* and *C. tyrobutyricum* from milk, hard cheese, and silage using a multiplex PCR test, and

determined that the method had good specificity. The potential of clostridial species to cause cheese spoilage can vary among different strains. In our study, based on the 16S rRNA sequence analysis of clostridial strains isolated from silage, raw milk, and Kashar cheese, *C. sporogenes* was determined

to be the most common species among all of our isolates. The findings of this study are consistent with the literature data indicating a high *C. sporogenes* prevalence, according to some researchers (Garde et al., 2011; Bakhtiary et al., 2018; Oliveira et al., 2018).

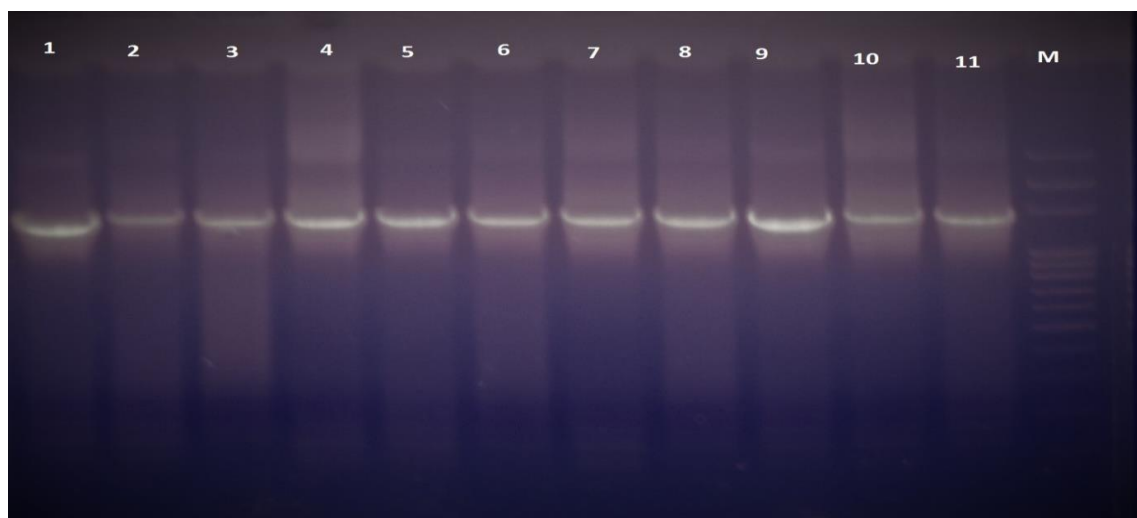


Figure 1. Shows the agarose gel image of PCR products of *Clostridium* spp. strains using 27F and 1492R universal primers, along with the Marker DNA.

\* M: Marker, Strains 1-11 are labeled, 1:CL79, 2:CL81, 3:CL97, 4:CL99, 5:CL101, 6:CL105, 7:CL135, 8:CL136, 9:CL148, 10:CL171, 11:CL177, size of the amplicon; 1500 bp

Table 1. Isolates of *Clostridium* spp. by sequence 16S rRNA gene sequencing

| Isolate | Source | Species similarity*           | Genbank Accession No | Total Number of Bases | Similarity score | Nucleotide identity (%) |
|---------|--------|-------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------|-------------------------|
| CL5     | Cheese | <i>Clostridium sporogenes</i> | LC153544.1           | 1382                  | 2531             | 99.71                   |
| CL12    | Cheese | <i>Clostridium sporogenes</i> | MF062498.1           | 1362                  | 2516             | 100                     |
| CL41    | Cheese | <i>Clostridium sporogenes</i> | MF062498.1           | 1379                  | 2547             | 100                     |
| CL79    | Cheese | <i>Clostridium sporogenes</i> | MT356160.1           | 1372                  | 2534             | 100                     |
| CL81    | Cheese | <i>Clostridium butyricum</i>  | MT510294.1           | 1090                  | 1960             | 99.17                   |
| CL54    | Milk   | <i>Clostridium sporogenes</i> | MF062498.1           | 1378                  | 2545             | 100                     |
| CL64    | Milk   | <i>Clostridium sporogenes</i> | MF062498.1           | 1378                  | 2545             | 100                     |
| CL68    | Milk   | <i>Clostridium sporogenes</i> | MF062498.1           | 1264                  | 2335             | 100                     |
| CL97    | Milk   | <i>Clostridium sporogenes</i> | MT356160.1           | 1356                  | 2505             | 100                     |
| CL99    | Milk   | <i>Clostridium butyricum</i>  | MT510294.1           | 1090                  | 1960             | 99.17                   |
| CL101   | Milk   | <i>Clostridium sporogenes</i> | MT356160.1           | 1382                  | 2553             | 100                     |
| CL105   | Milk   | <i>Clostridium butyricum</i>  | MT510294.1           | 1138                  | 2084             | 100                     |
| CL135   | Silage | <i>Clostridium sporogenes</i> | MT356160.1           | 1375                  | 2540             | 100                     |
| CL136   | Silage | <i>Clostridium sporogenes</i> | MT356160.1           | 1364                  | 2468             | 99.56                   |
| CL148   | Silage | <i>Clostridium sporogenes</i> | MT356160.1           | 1379                  | 2519             | 99.57                   |
| CL171   | Silage | Sequence failed               | -                    | -                     | -                | -                       |
| CL177   | Silage | <i>Clostridium sporogenes</i> | MT356160.1           | 1375                  | 2516             | 99.85                   |

\*The species were identified by means of 16S universal primers when sequence similarity was  $\geq 98\%$  in the GenBank database, using BLASTn sequence similarity searching (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Fermentation product of *Clostridium* spp.**

In addition to accurate identification of *Clostridium* spp., it is also important to detect fermentation products during sporulation. After sporulation, Gas production and displacement of the paraffin

plugs were observed in the tested tubes of the strains. The volatile compounds highlighted by GC-MS were sulfite, ester, alcohol, and acid group compounds (Figure 2).

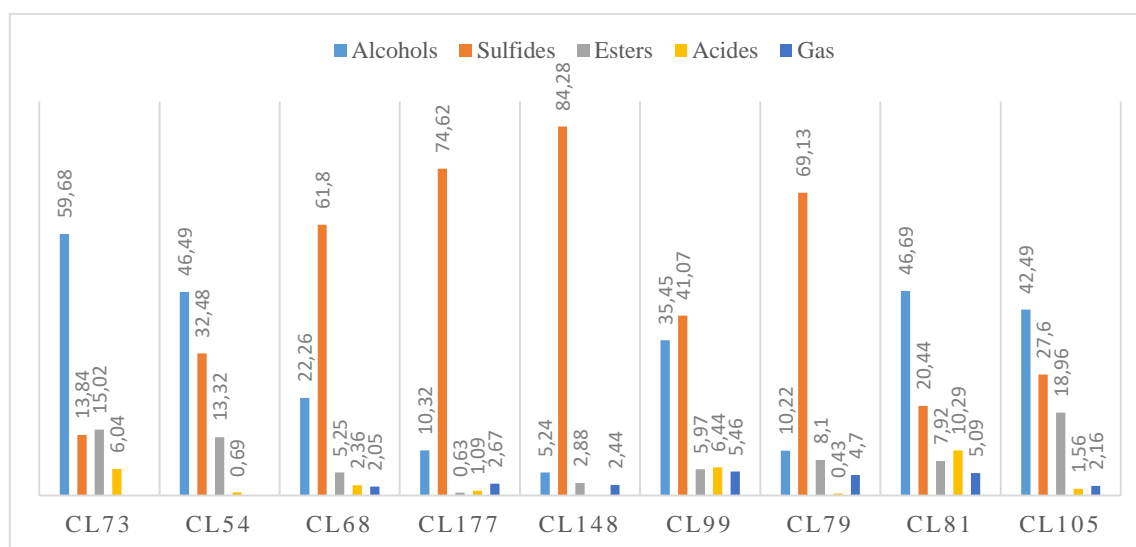


Figure 2. The prominent components of clostridial strains causing late-blowing in cheese analyzed by GC-MS

In a study characterizing volatile metabolites in *Clostridium* species using GC-MS-SPME, it was found that the molecules contained both saturated and aromatic sulfur-containing heterocyclic compounds, sulfides, esters, carboxylic acids and alcohols (Rees et al., 2016). The researchers indicated that the butyric acid, acetic acid, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> gases produced by clostridial strains were responsible for late blowing in semi-hard and hard cheeses, leading to unpleasant odors and flavors and causing significant economic losses for businesses (Doyle et al., 2015; Brändle et al., 2016; Silveti et al., 2018). Disulfide, trisulfide, and tetrasulfide compounds were the most common among the sulfite group compounds and had the highest proportion in this study. Butyrate, acetate, butanoate, valerate, and heptanoate esters were among the ester group compounds. *C. sporogenes* was found to produce butyrate using lactate, pyruvate, and mostly free amino acids (Le Bourhis et al., 2007; Rainey et al., 2009).

The organic acids formed in the acidogenic phase of the ABE fermentation prevent the inhibition caused by organic acids from reaching critical levels by turning into acetone and butanols in the solventogenic phase (Jones and Woods, 1986). In our study, alcohols such as butanol, pentanol, ethanol, hexanol, propanol, and octanol, and acids such as butanoic and acetic acid were commonly detected in all *Clostridium* strains (Figure 3).

Butanol was detected in *C. butyricum* strains as the highest in CL81 (43.38%) and CL105 (38.11%). In a study, cultures containing *C. tyrobutyricum* and *C. beijerinckii* were found to produce 0.5 mM - 0.7 mM 1-butanol at low concentrations (Driehus et al., 2016). It is stated that butanol has a toxic effect on *Clostridium* spp. and stops metabolism at concentrations above 20 g/L (Qureshi and Blaschek, 1999). In *C. butyricum* CL81 strain, the production of butyric and acetic acids was determined as 2.12% and 8.18%, respectively. The acetic acid production of *C. sporogenes* CL68 and CL73 strains was found to be 6.04% and 2.36%, respectively. *C. sporogenes* CL54 and CL177

strains were also found to produce low levels of pentanoic and butanoic acids in addition to acetic acid. Driehuis et al. (2016) stated that *C.*

*tyrobutyricum* and *C. beijerinckii* strains completely consumed lactic acid and produced acetic and butyric acids using glucose.

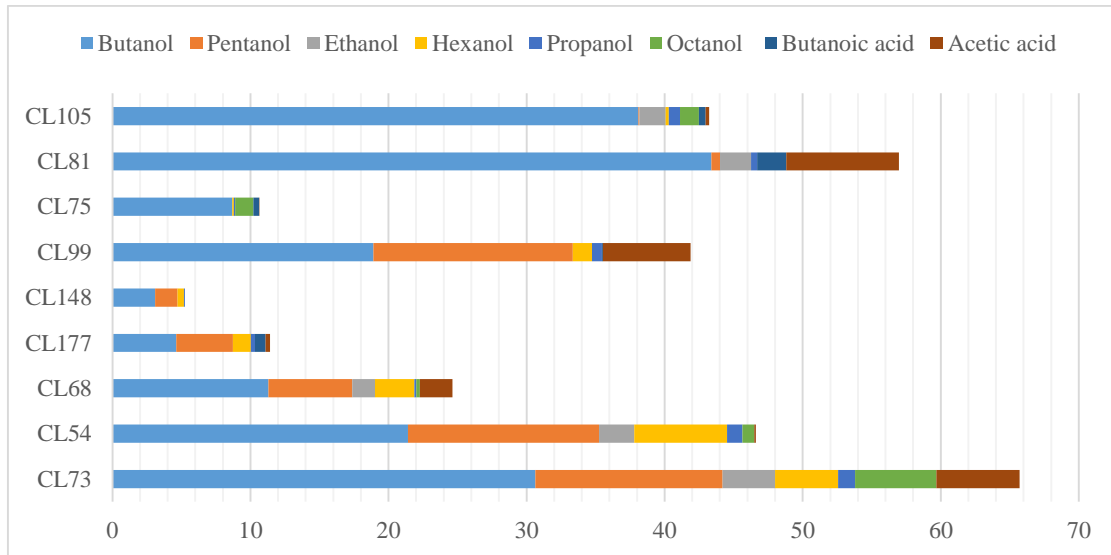


Figure 3. Alcohol and acid group compounds detected in clostridial strains

#### Endospore morphology of clostridial strains

Chemical changes such as the release of calcium dipicolinate from structural components of endospores and determination of endospore location can be achieved by SEM imaging (Cabrera-Martinez et al., 2003). In this study, SEM images taken at the beginning of sporulation showed that the cells were rod-shaped and belonged to the genus *Bacillus*, forming terminal and subterminal endospores. The length of the

cells varied between 3-5  $\mu\text{m}$  (Figure 4). The use of PBS buffer before SEM imaging, observation under a low vacuum and a gold plating technique provided a sharp border appearance in the clostridial cells. The size and range of the isolated clostridial bacteria were found to be consistent with the results of other researchers who used gold coating and buffer solutions (Bassi et al., 2009).

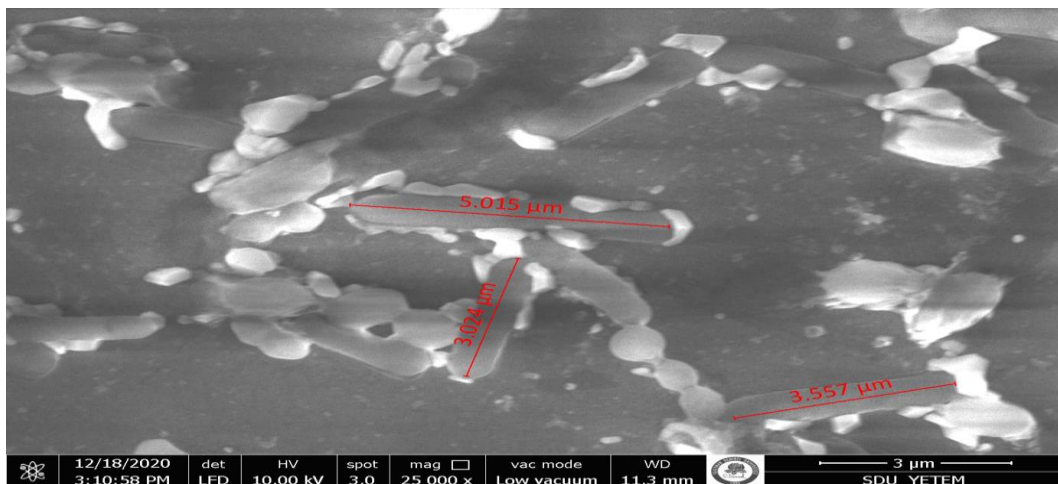


Figure 4. SEM image of *C. sporogenes* CL68 strain at the beginning of sporulation

During sporulation, SEM imaging and GC-MS analysis revealed that the cell wall remnants and endospore structural components of *Clostridium sporogenes* CL177 and CL68 strains, which have a total relative percentage area greater than >50%

for the sulfide group compound, were more intensively present compared to *Clostridium butyricum* CL81 strain with high butanol production (Figure 5).

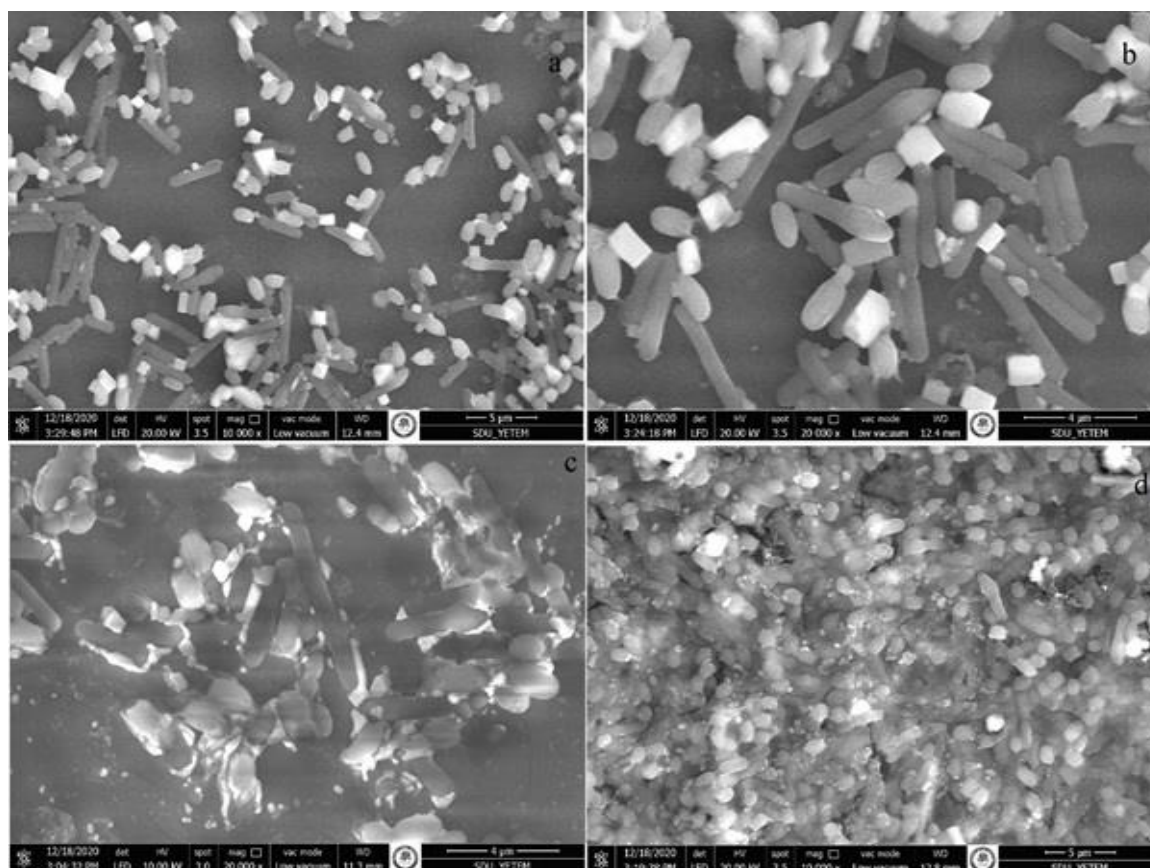


Figure 5. SEM images of *C. sporogenes* and *C. butyricum* strains during sporulation

\*a: *C. butyricum* CL81 strain at the beginning of sporulation; b: *C. butyricum* CL81 strain at the end of sporulation; c: *C. sporogenes* CL68 strain at the beginning of sporulation; d: *C. sporogenes* CL68 strain at the end of sporulation

During the final stage of sporulation, SEM imaging revealed that sporulation had progressed and spores had changed in size to approximately 1  $\mu\text{m}$  in width and 1.7  $\mu\text{m}$  in length. Some cells had started to form nuclei and exosporium (Figure 5). In a study on SEM imaging of *C. sporogenes*, it was found that the exosporium surrounds all the spores and has a rough, oval appearance with a typical length of 3  $\mu\text{m}$ . It was also observed that exosporium played a role in adhering to cells after sporulation. Some studies on SEM imaging support this finding (Faille et al., 2007; Lequette et al., 2011).

## CONCLUSION

This study investigated LBD clostridial strains isolated from different sources through 16S rRNA sequence analysis, and the strains were identified as *C. sporogenes* and *C. butyricum* at the species level. The GC-MS analysis of volatile compounds produced by clostridial strains during fermentation revealed that these strains produce a range of products such as acids, alcohols, sulfites, esters that can cause significant product loss in hard and semi-hard cheeses. During SEM imaging, the use of PBS buffer, low vacuum observation, and gold coating technique provided



a sharp boundary appearance in clostridial cells, allowing successful observation of endospore structural compounds. In future studies, SEM can be used as a sensitive tool to gain more information about chemical changes in LBD clostridial strains, such as internal spore structure and calcium dipicolinate release, with additional techniques for evaluation.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Pelin Ertürkmen: Conceptualization, methodology, investigation, formal analysis, writing - original draft. Zübeyde Öner: Project administration, supervision, conceptualization, methodology, writing-review and editing. All authors read and approved the final manuscript.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was part of a doctoral dissertation (Pelin Ertürkmen, FDK-2019-6943) supported by the Scientific Research Projects Unit of Suleyman Demirel University, Isparta, Türkiye.

### REFERENCES

Bakhtiary, F., Sayevand, H.R., Remely, M., Hippe, B., Indra, A., Hosseini, H., Haslberger, A.G. (2018). Identification of *Clostridium* spp. derived from a sheep and cattle slaughterhouse by Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and 16S rDNA sequencing. *International Journal of Food Science Technology*, 55(8):3232-3240.

Bassi, D., Cappa, F., Cocconcelli, P.S. (2009). A combination of SEM technique and X-ray microanalysis to study spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. *Research in Microbiology*, 160:322-329.

Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S., Cocconcelli, P.S. (2013). Taqman Real Time-Quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *International Dairy Journal*, 33:75-82.

Brändle, J., Domig, K.J., Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing Clostridia in milk and cheese. *Food Control*, 67:96-113.

Brunt, J., Cross, L.K., Peck, M.W. (2015). Apertures in the *Clostridium sporogenes* spore coat and exosporium align to facilitate emergence of the vegetative cell. *Food Microbiology*, 51:45-50.

Cabrera-Martinez, R.M., Tovar-Rojo, F., Vepachedu, V.R., Setlow, P. (2003). Effects of overexpression of nutrient receptors on germination of spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 185(8):2457-2464.

Chean, R., Kotsanas, D., Francis, M.J. (2014). Comparing the identification of *Clostridium* spp. by two matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry platforms to 16S rRNA PCR sequencing as a reference standard: A detailed analysis of age of culture and sample preparation. *Anaerobe*, 30(12):85-89.

Cremonesi, P., Vanoni, L., Silvetti, T., Morandi, S., Brasca, M. (2012). Identification of *Clostridium beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a Multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research*, 79:318-323.

D'Incecco, P., Pellegrino, L., Hogenboom, J.A., Cocconcelli, P.S., Bassi, D. (2018). The late blowing defect of hard cheeses: behaviour of cells and spores of *Clostridium tyrobutyricum* throughout the cheese manufacturing and ripening. *LWT*, 87:134-141.

Doyle, C.J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 197:77-87.

Driehuis, F., Hoolwerf, J., and Rademaker, J.L.W. (2016). Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. *International Dairy Journal*, 63:70-77.

Ertürkmen P., Öner Z. (2023). Challenging the problematic detection of clostridial isolates



- causing late-blowing defect with MALDI-TOF MS. *Czech Journal Food Science*, 41(1):36-43.
- Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelievre, C., Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: Consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of Food Protection*, 70, 2346-2353.
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., Nuñez, M. (2011). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: Identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal*, 21:272-278.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., Garde, S. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology*, 42:82-88.
- Jakob, E. (2011). Analytik Rund Um Die Buttersäuregärung. In Alp Forum (Vol. 85, Pp.1-23.
- Jones, D.T., Woods, D.R. (1986). Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50:484-524.
- Julien, M.C., Dion, P., Lafrenie`re, C., Antoun, H., Drouin, P. (2008). Sources of clostridia in raw milk on farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:6348-6357.
- Keto-Timonen, R., Heikinheimo, A., Eerola, E., Korkeala, H. (2006). Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:4057-65.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, Editors. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: Wiley. Pp. 115-175.
- Le Bourhis, A.G., Dore, J., Carlier, J.P., Chamba, J.F., Popoff, M.R., Tholozan, J.L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113:154-63.
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2):209-228.
- Lequette, Y., Garenaux, E., Tauveron, G., Dumez, S., Perchat, S., Slomianny, C., Lereclus, D., Guerardel, Y., Faille, C. (2011). Role played by exosporium glycoproteins in the surface properties of *Bacillus cereus* spores and in their adhesion to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 77:4905-4911.
- Lo´pez-Enr´iquez, L., Rodr´iguez-La´zaro, D., Hern´andez, M. (2007). Quantitative detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk by Real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(37), 47-51.
- Matijasic, B.B., Rajsp, M.K., Perko, B., Rogelj, I. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasserii*. *International Dairy Journal*, 17:157-166.
- Mc Sweeney, P.L.H. (2007). What is late gas blowing and how may this defect be avoided. In Mcsweeney (Ed.) *Cheese Problems Solved* Boca Raton, USA: CRC Press, 198-199.
- Oliveira, R.B.A., Lopes, L.S., Baptista, R.C., Chinha, A.A.I.A., Portela, J.B., Nascimento, J.S. (2018). Occurrence, populations, diversity, and growth potential of spore-forming bacteria in "Requeijão Cremoso". *LWT-Food Science and Technology*, 89, 24-31.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J., Leonard, F.C. (2002). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Oxford, UK: Blackwell Science.
- Qureshi, N., Blaschek, H.P. (1999). Production of Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) by a hyperbutanol producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation. *Biotechnology Progress*, 15:594-602.
- Qureshi, N., Ezeji, T.C. (2008). Butanol, "A Superior Biofuel" production from agricultural residues (Renewable Biomass): Recent Progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery*, 2:319-330.

Rainey, F. A., Hollen, B. J., Small, A. (2009). Genus I. *Clostridium prazmowski*, 1880, 23a. In P. Vos, G. Garrity, D. Jones NR. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes* New York: Springer, 3:736-827.

Rees, C. A., Shen, A., Hill, J.E. (2016). Characterization of the *Clostridium difficile* volatile metabolome using comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1039:8-16.

Silvetti, T., Morandi, S., Brasca, M. (2018). Growth factors affecting gas production and reduction potential of vegetative cell and spore inocula of dairy-related *Clostridium* species. *LWT*, 92:32-39.

Turchi, B., Pero, S., Torracca, B., Fratini, F., Mancini, S., Galiero, A. (2016). Occurrence of *Clostridium* spp. in Ewe's milk: Enumeration and identification of isolates. *Dairy Science and Technology*, 96(5):693-701.



**INVESTIGATION OF FLAVOUR PERMANENCE OF STRAWBERRY AND WATERMELON FLAVOURED CHEWING GUMS BY USING RETRONASAL AROMA TRAPPING DEVICE AND SENSORY ANALYSIS TECHNIQUES**

**Pınar Uzun<sup>1,2</sup>, Ahmet Emir Özünal<sup>1</sup>, Melis Ayabakan<sup>1</sup>, Hakan Başkaya<sup>1</sup>, Nuray Doğan<sup>1</sup>, Sonay Merve Gülay<sup>1</sup>, Büşra Hantal<sup>1</sup>, Melike Üner<sup>3</sup>, Aslı Barla Demirkoz<sup>\*\*4</sup>**

<sup>1</sup>Aromsa Flavours and Food Additives Inc. Co., Depr of Research and Development Center, Kocaeli, Turkey

<sup>2</sup>Isparta University of Applied Sciences, Gelendost VS, Department of Food Technology, Isparta, Turkey

<sup>3</sup>Istanbul University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Istanbul, Turkey

<sup>4</sup>Haliç University, Department of Nutrition and Dietetics, İstanbul, Turkey

*Received / Geliş:* 18.11.2021; *Accepted / Kabul:* 04.04.2022; *Published online / Online baskı:* 07.04.2022

Uzun, P., Özünal, A. E., Ayabakan, M., Başkaya, H., Doğan, N., Gülay, S. M., Hantal, B., Üner, M., Barla Demirkoz A. B. (2022). Investigation of flavour permanence of strawberry and watermelon flavoured chewing gums by using retronasal aroma trapping device and sensory analysis techniques. *GIDA* (2022) 47 (3) 408-419 doi: 10.15237/gida.GD21139

Uzun, P., Özünal, A. E., Ayabakan, M., Başkaya, H., Doğan, N., Gülay, S. M., Hantal, B., Üner, M., Barla Demirkoz A. B. (2022). Çilek ve karpuz aromalı sakızlarda aroma kalıcılığının retronasal aroma-yakalama cihazı ve duyuşsal analiz teknikleri kullanılarak araştırılması. *GIDA* (2022) 47 (3) 408-419 doi: 10.15237/gida. GD21139

**ABSTRACT**

Combining in vivo instrumental analysis with sensory evaluation techniques to analyze the release of volatile components from the gum matrix is gaining importance due to the flavour expectations of consumers. Besides consumers' preferences and quality of flavourings determine the market value of chewing gums. In this study, strawberry and watermelon flavoured chewing gums were prepared and evaluated with both sensory evaluation and analytical techniques by using retronasal aroma trapping device and dynamic headspace analysis - DHA-GC/MS. Ethyl hexanoate and isoamyl acetate were chosen as flavour compounds for strawberry and watermelon flavoured gums to monitor in the study. The in vivo experiment with retronasal aroma trapping device showed that selected compounds were quite intense in the first 5 min of breath, and they were also detected in the 45<sup>th</sup> min of chewing. The flavour stability of the chewing gums was also monitored for 3 months. According to all sensory and instrumental analyzes, watermelon flavour was perceived as watermelon taste both at the 45<sup>th</sup> min and at the end of shelf life (equal to 12 months).

**Keywords:** Flavoured chewing gum, flavour permanence, retronasal aroma trapping device, sensory evaluation technics

\* *Corresponding author/ Yazışmalardan sorumlu yazar*

✉ aslibarla@gmail.com

☎: (+90) 262 326 1111

☎: (+90) 262 751 1390

\*\* *This manuscript was printed previously at J of FOOD. An author name added as erratum / Daha önce GIDA dergisinde basılmış olan bu makaleye düzeltme olarak bir yazar ismi eklenmiştir.*

Pınar Uzun; ORCID no: 0000-0001-8525-4111 ; Ahmet Emir Özünal; ORCID no: 0000-0001-8498-2491

Melis Ayabakan; ORCID no: 0009-0003-6475-0038 ; Hakan Başkaya; ORCID no: 0000-0003-2510-3367

Nuray Doğan; ORCID no: 0000-0001-8323-9487 ; Sonay Merve Gülay; ORCID no: 0000-0002-4519-4836

Büşra Hantal; ORCID no: 0000-0003-0936-564X ; Melike Üner; ORCID no: 0000-0003-2786-5947

Aslı Barla Demirkoz; ORCID no: 0000-0002-3261-0212



**COMPARATIVE INVESTIGATION OF THE USE OF STEROL COMPOSITION,  
ECN42 DIFFERENCE AND FTIR SPECTROSCOPY IN THE  
DETERMINATION OF VIRGIN OLIVE OIL ADULTERATION**

**Ebru Karacan, Onur Özdikicierler\*, Fahri Yemişçioglu**

Ege University, Faculty of Engineering, Food Engineering Department, İzmir, Türkiye

Received /Geliş: 09.02.2023; Accepted / Kabul: 13.03.2023; Published online / Online baskı: 17.04.2023

Karacan, E., Özdikicierler, O., Yemişçioglu, F. (2023). Comparative investigation of the use of Sterol composition, ECN42 difference and FTIR spectroscopy in the determination of virgin olive oil adulteration. GIDA (2023) 48 (3) 510-525 doi: 10.15237/ gida.GD23024

Karacan, E., Özdikicierler, O., Yemişçioglu, F. (2023). Natürel zeytinyağı tağışışinin tespitinde sterol kompozisyonu, ECN42 farkı ve FTIR spektroskopisinin kullanımının karşılaştırmalı olarak incelenmesi. GIDA (2023) 48 (3) 510-525 doi: 10.15237/ gida.GD23024

**ABSTRACT**

Due to its high price and consumer demand, virgin olive oil is an essential product vulnerable to deception for unfair economic gain. In our research, sunflower, palm olein and cottonseed oil were used as adulterants in different amounts for the preparation of adulterated samples. Sterol composition, the difference in theoretical and actual equivalent carbon number 42 triglycerides ( $\Delta$ ECN42) value and FTIR spectra were used to classify the adulterated and virgin olive oil samples. Decision trees on  $\Delta$ 7-stigmastenol and campesterol allowed the detection of 10% and higher adulteration.  $\Delta$ ECN42 ad FTIR provided good detection of the adulterated samples, even for the mixed oils at 1% concentration. However, the detecting performance of the FTIR decreased as the virgin olive oil sample set expanded with different seasons and varieties. Correct multivariate approach and FTIR data selection significantly influence the performance of FTIR spectroscopy for detecting VOO adulteration.

**Keywords:** Virgin olive oil, adulteration, fatty acid composition, sterol composition,  $\Delta$ ECN42, FTIR, LDA

**NATÜREL ZEYTİNYAĞI TAĞİŞİŞİNİN TESPİTİNDE STEROL  
KOMPOZİSYONU, ECN42 FARKI VE FTIR SPEKTROSKOPİSİNİN  
KULLANIMININ KARŞILAŞTIRMALI OLARAK İNCELENMESİ**

**ÖZ**

Natürel zeytinyağı, yüksek tüketici talebi ve fiyatı nedeniyle haksız ekonomik kazanç sağlamak için yapılan hileli uygulamalara açık bir üründür. Araştırmamızda ayçiçek yağı, palm olein ve pamuk yağı natürel zeytinyağına farklı oranlarda karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım yağların natürel zeytinyağından ayırımının incelenmesi için örneklerin sterol kompozisyonu,  $\Delta$ ECN42 değeri ve FTIR spektrumları kullanılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Mevzuatta belirtilen  $\Delta$ 7-stigmastenol ve kampesterol üzerindeki karar ağaçları, %10 ve daha yüksek tağışışinin saptanmasını mümkün kılmıştır.  $\Delta$ ECN42 ve FTIR spektroskopisi ile %1 konsantrasyonda hazırlanan karışım yağlar bile, natürel

\* Corresponding author/ Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: onur.ozdikicierler@ege.edu.tr

☎: (+90) 232 311 3001

☎: (+90) 232 311 4831

Ebru Karacan; ORCID no: 0000-0001-7144-8820

Onur Özdikicierler; ORCID no: 0000-0002-8959-4794

Fahri Yemişçioglu; ORCID no: 0000-0003-3957-9921

zeytinyağı numunelerinden ayrılmıştır. Ancak, natürel zeytinyağı numune sayısı, farklı mevsimler ve çeşitlerle genişletildiğinde, FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirilen ayrımın hassasiyeti azalmış ve özellikle düşük konsantrasyonlu karışım yağların ayrımı zorlaşmıştır. Doğru çok değişkenli yaklaşım ve FTIR veri seçimi, natürel zeytinyağı tağışını saptamak için FTIR spektroskopisinin performansını önemli ölçüde etkilemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Natürel zeytinyağı, tağış, yağ asidi kompozisyonu, sterol kompozisyonu,  $\Delta$ ECN42, FTIR, LDA

### INTRODUCTION

Olive oil is a product having high economic importance for Mediterranean countries, obtained from the fruit of the olive tree (*Olea europaea* L.). Considering the costs of cultivation, production and storage periods, extra virgin olive oil, which is the highest quality class, is expected to have a higher price than virgin and lampante olive oils (Balkan and Meral, 2017; Anonymous, 2022; Filoda et al., 2019; Tsimidou et al., 2015; Uncu et al., 2017). In addition, consumer demand for extra virgin olive oil is increasing due to its unique flavor and high amount of natural antioxidants (Mariotti and Peri, 2014; Vitaglione et al., 2015). Because of its high price and increasing demand, extra virgin olive oil has become most vulnerable to fraudulent activities (Pan et al., 2018; Uncu et al., 2017). These fraudulent activities, generally called adulteration, are practiced to obtain unfair economic benefits by misleading the consumer about the origin, quality class or product content of virgin olive oil (VOO) by presenting false information on the label. The most common form of adulteration for VOO is mixing different vegetable oil with lower economic value into VOO (Tsimidou et al., 2015).

European Union legislation and Codex Alimentarius criteria set the VOO quality and purity limits to determine the quality classes and present the right product to be audited to the consumer (Anonymous, 2017; Anonymous, 2022). In particular, sterol composition and the difference between contents of theoretical and actual triglycerides having 42 equivalent carbon numbers (ECN) are the most examined purity criteria for adulterations made by mixing seed oils with VOO. On the other hand, sterol composition and  $\Delta$ ECN42 techniques have many disadvantages, such as requiring labor and chemicals and generating a significant amount of chemical waste in the analysis process. Applying

rapid measurement techniques coupled with advanced statistical methods stands out in terms of efficient labor and time use by overcoming sample loss and the excessive use of chemicals recently (Uncu et al., 2019).

Chemometrics was defined as a multidisciplinary assessment technique in which mathematics, statistics and computer science are integrated to determine the most influential variables from extensive data obtained from chemical analysis to apply statistical evaluation (Massart et al., 1998). In this respect, chemometric techniques include using multivariate analysis methods to evaluate analytical or spectroscopic results and examine the possible differences and classifications between sample groups. Principal component analysis (PCA), linear discriminant analysis (LDA), hierarchical clustering analysis (HCA), and partial least squares (PLS) are widely used for chemometric assessment of VOO adulteration (Esteki et al., 2018; Gómez-Caravaca et al., 2016).

Various fast-measurement techniques have been used to detect VOO adulteration or predict adulterant concentration. UV-Visible (UV-Vis) spectroscopy, Near Infrared Spectroscopy (NIR), Raman Fluorescence Spectroscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method and Differential Scanning Calorimetry (DSC) are the most used techniques in VOO adulteration studies (Aroca-Santos et al., 2016; Chiavaro, 2014; Lia et al., 2018; Milanez et al., 2017; Nigri and Oumeddour, 2013; Ordoudi et al., 2022; Öztürk et al., 2010; Zhang et al., 2011). Studies were mainly carried out with model samples prepared by mixing one or more selected VOO and adulterant oil. In most studies, VOO / adulteration oil ratios are generally designed between 0% and 100% to efficiently determine the mathematical relations between the

concentration of the adulteration and the spectroscopic responses. However, detection becomes more difficult as the proportion of adulteration oil in VOO decreases (<10%), which makes detecting adulterations in lower concentrations the main challenge. In addition, most of the purity criteria specified in the legislation can quickly reveal VOO adulteration containing 10% or more vegetable oil (Baeten et al., 2005; Green et al., 2020). In that manner, the detection performance of the spectroscopic and chromatographic methods became more significant when VOO adulteration in low concentrations was considered. Few studies compare the commonly used spectroscopic methods with traditional chromatographic techniques in detecting VOO adulteration.

In this study, the detection performances of the sterol composition,  $\Delta$ ECN42 values and FTIR spectral data were compared for the prepared adulterated VOO samples using sunflower oil, palm olein and cottonseed oil at low ratios (1-4-7-10-13%). Moreover, change in the detection performance of FTIR was evaluated by expanding the database size of VOO with different varieties and regions.

## MATERIAL AND METHOD

### Material

Thirty geographically indicated (GI) VOO samples were obtained from related Chamber of Commerce bureaus representing the 2019-2020 and 2020-2021 harvest seasons (at least five samples from each season) as VOO samples. GI VOO samples were, namely, Ayvalık Zeytinyağı, Edremit Zeytinyağı and Milas Zeytinyağı, registered by Turkish Patent and Trademark Office with dossier numbers C2004/003, C2017/048 and C2014/043, respectively. Among these, only VOO samples that fit "extra virgin olive oil" criteria according to FFA, PV and specific absorption values were used to reduce the variation due to the quality criteria and obtain comparable results. Olive oil samples were abbreviated as VOO as an indication of the main category name of the olive oils.

To prepare mixtures (will be mentioned as "adulterated samples" in the text), three different vegetable oil samples (will be mentioned as "adulterants" in the text) were used. For this purpose, as adulterant samples, refined sunflower oil, cottonseed oil, and palm olein were obtained from various companies in İzmir, Türkiye.

Adulterated samples were prepared by mixing a selected VOO sample (Ayvalık Zeytinyağı from the 2019-2020 season) and adulterants with the binary combination. The adulterant ratios were maintained as 1-4-7-10-13% in adulterated samples for each adulterant. In this way, 15 adulterated samples were prepared separately for each adulterant.

Samples were coded representing the adulterant used and its percentage in the mixture. The adulterated samples containing sunflower oil, palm olein, and cottonseed oil were coded as SOVO, POVO, and CSVO, respectively. The adulterant concentration in the mixture was indicated as a percentage right after the sample code.

VOO, adulterant and adulterated samples were placed in 150 ml brown bottles without leaving any headspace and stored at -40°C until the analyzes were carried out.

The chemicals and standards used in the analyzes were obtained directly from the local distributors of Merck and Sigma-Aldrich brands at the purity level specified in the analysis methods.

### Methods

#### *Determination of sterol composition*

The sterol composition of the samples was determined according to the Turkish Food Codex Communiqué on Olive Oil and Olive Pomace Oil Analysis Methods (Communiqué No: 2014/53), and the peak areas were expressed as a percentage. This method refers to the thin layer chromatography method for determining the sterol fraction of animal and vegetable oils and fats composition. Analysis was carried out by saponification of the sample, extraction of the unsaponifiable matter and separation of the

sterols using thin layer chromatography, and determining sterol composition by gas chromatography. For this purpose, 0.5 ml of 0.1% concentration 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol internal standard was added to 2-2.5 grams of oil sample. This sample was subjected to saponification using 20 ml of 2 N ethanolic potassium hydroxide (KOH) solution in a water bath at 98°C for 20 minutes. The saponification reaction was terminated with 20 ml of distilled water, the unsaponifiable fraction extracted from the soap fraction with 20 ml of diethyl ether, and the residual soap was removed with approximately 80 ml of distilled water. This unsaponifiable fraction was fractionated on Silica gel 20 $\times$ 20 cm (Sigma Aldrich, Germany) Thin Layer Chromatography (TLC) plates and with 110 ml of hexane and 65 ml of diethyl ether for 70 minutes. The sterol band marked with 0.2% 2',7' dichlorofluorescein dye, and sterol fraction were scraped from the plate. The sterols were derived for gas chromatography (GC) with a mixture of N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide reagents containing Pyridine and trimethylchlorosilane at 1:1 ratio. A SE-54 column (5%-phenyl-1%-vinylmethylpolysiloxane, 30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) was used for chromatographic analysis. GC conditions were selected as follows; carrier gas: helium, the flow rate of carrier gas: 0.9 ml/min., flame ionization detector (FID) temperature: 290°C, injector temperature: 280°C, furnace temperature: 260°C 1:40 split ratio.

### *Determination of fatty acid composition*

The fatty acid composition of samples was determined according to the International Olive Council (IOC) standard method (Anonymous, 2017b). For this analysis, 0.1 grams of sample was mixed with 2 ml of heptane, and the mixture was transesterified with 0.2 ml of 2N methanolic KOH solution. The upper phase containing methyl esters was injected into GC (Agilent 7820). The GC oven temperature was maintained at an initial temperature of 165 °C and then gradually increased to 200 °C. The injection block temperature was set at 250°C and the FID detector temperature at 280°C. The flow rate of the carrier gas will be 1.2 ml/min. The injection volume was 2  $\mu$ l. The peak areas were determined,

and fatty acid composition was expressed as percentages.

### *Determination of the difference between the actual and theoretical content of triacylglycerols with ECN42 ( $\Delta$ ECN42)*

Triglyceride profile analysis and determination of the actual content of triglycerides with ECN42 ( $\Delta$ ECN42) of adulterated samples was carried out with HPLC Agilent 1200 (California, USA) utilized with Refractive Index Detector (RID) using the method specified by the IOC (Anonymous, 2017c). For this analysis, 0.05 grams of oil sample was dissolved in 1 ml of acetone. The mobile phase was prepared to contain 63.6% acetone and 36.4% acetonitrile, filtered and degassed in an ultrasonic bath. Analysis was conducted with a mobile phase flow rate of 1.5 ml/min and an RI detector temperature of 40°C. TG rates are given in percent (%). The  $\Delta$ ECN42 values were calculated via the excel file provided under the so-called method appendices of IOC.

### *Determination of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra*

FTIR spectra of the samples were measured on the Shimadzu (Kyoto, Japan) IRAffinity-1S spectrometer system. The detector consists of a DLATGS detector with a temperature control mechanism and a beam splitter germanium-coated KBr. Two drops of oil samples were placed directly on the ATR cell, and spectra were taken in the mid-infrared region (4000 – 600  $\text{cm}^{-1}$ ) at 2  $\text{cm}^{-1}$  resolution with 32 interferograms. Before each measurement, the atmospheric measurement was taken and subtracted from each spectrum. After each reading, the ATR crystal was cleaned with hexane and acetone to ensure no residue from the previous sample remained on the crystal surface.

All spectra were imported to the IR Solution v1.5 software, and some pre-processing procedures were followed to minimize uninformative distribution among samples. First, spectra were manipulated with ATR Correction at 650  $\text{cm}^{-1}$  reference value. Then, 11-point smoothing was applied according to the Savitzky-Golay



algorithm, and 2<sup>nd</sup>-degree derivatization was carried out. The spectral regions over 650 cm<sup>-1</sup> and below 3100 cm<sup>-1</sup> were eliminated with the cut function, and a new data set was obtained.

#### Statistical analysis and chemometric method

Pre-processed FTIR data were imported into SPSS 26 (IBM, USA) and then classified according to the purity level as VOO, SOVO, POVO, and CSVO with percentages. For the second LDA, in addition to the VOO sample used in the preparation of the adulterated samples, five 2020-2021 Ayvalık, five 2019-2020 Edremit and five 2019-2020 Milas samples were defined as VOO, and the LDA data set was expanded. The expanded VOO sample set was labeled as VOO-EXT for the repeated LDA.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chemical characteristics of VOO, sunflower oil, cottonseed oil and palm olein samples

The fatty acid, triglyceride, and sterol compositions of the VOO, refined sunflower oil, cottonseed oil, and palm olein samples used to prepare adulterated samples are given in Table 1, Table 2 and Table 3. The quality criteria and compositional properties of all oil samples (VOO, refined sunflower oil, cottonseed oil and palm olein oil) included in this study met the purity criteria defined in the related Codex

Alimentarius standards (Anonymous, 1999, 2017).

According to the fatty acid compositions in Table 1, the C14:0 value of palm olein had a higher level (1.10%) than the other vegetable oils in our study. Also, it was observed that palm olein and cottonseed oil had a higher percentage of C16:0 than the other two oils, 41.47% and 22.93%, respectively. In contrast, sunflower oil had the lowest content, with 6.19% of C16:0. Çalışlar et al. (2018) similarly stated that palm olein is a high source of palmitic acid (C16:0) (Çalışlar et al., 2018). It can be noted that the margaric acid (C17:0) values are similar in all pure vegetable oils in this study. Still, VOO's heptadecenoic acid (C17:1) level stands out at 0.24%. The level of stearic acid (C18:0), a saturated fatty acid, in sunflower oil and palm olein was higher than in cottonseed oil. In parallel, Anushree et al. (2017) stated that sunflower and palm oil are high sources of stearic acid. It was claimed that some types of sunflower oil obtained from improved and/or biotechnologically treated sunflower seeds would be an alternative to palm oil (Anushree et al., 2017). VOO was characterized by high oleic acid (C18:1) content, as seen in Table 1. VOO had the highest oleic acid value at 69.38%, followed by palm olein oil at 41.68%. Sunflower oil has the highest linoleic acid (C18:2) content of 68.44%.

Table 1. Fatty acid compositions of VOO, sunflower oil, cottonseed oil and palm olein samples

|       | VOO        | Sunflower oil | Cottonseed oil | Palm olein |
|-------|------------|---------------|----------------|------------|
| C14:0 | 0.02±0.00  | 0.06±0.00     | 0.69±0.01      | 1.10±0.02  |
| C16:0 | 13.78±0.27 | 6.19±0.21     | 22.93±0.57     | 41.47±1.12 |
| C16:1 | 0.88±0.02  | 0.09±0.00     | 0.55±0.01      | 0.21±0.00  |
| C17:0 | 0.16±0.00  | 0.03±0.00     | 0.08±0.00      | 0.08±0.00  |
| C17:1 | 0.24±0.00  | 0.03±0.00     | 0.03±0.00      | 0.04±0.00  |
| C18:0 | 2.84±0.05  | 4.01±0.08     | 2.42±0.05      | 3.89±0.10  |
| C18:1 | 69.38±2.48 | 21.94±0.76    | 16.27±0.34     | 41.68±1.08 |
| C18:2 | 11.29±0.26 | 68.44±1.54    | 57.67±1.07     | 10.78±0.22 |
| C20:0 | 0.49±0.01  | 0.23±0.01     | 0.18±0.00      | 0.27±0.01  |
| C18:3 | 0.68±0.02  | 0.09±0.00     | 0.13±0.00      | 0.21±0.00  |
| C20:1 | 0.31±0.01  | 0.12±0.00     | 0.04±0.00      | 0.13±0.00  |
| C22:0 | 0.14±0.00  | 0.05±0.00     | 0.08±0.00      | 0.06±0.00  |
| C24:0 | 0.07±0.00  | 0.02±0.00     | 0.10±0.00      | 0.05±0.00  |

## Detecting virgin olive oil adulteration: Sterols, ECN42, and FTIR compared

Table 2. Triglyceride compositions of VOO, sunflower oil, cottonseed oil and palm olein samples

|                        | VOO        | Sunflower oil | Cottonseed oil | Palm olein |
|------------------------|------------|---------------|----------------|------------|
| LLL                    | 0.16±0.00  | 0.13±0.00     | 0.54±0.01      | 0.49±0.02  |
| OLL <sub>n</sub> +PoLL | 0.23±0.01  | 0.03±0.00     | 0.40±0.01      | 2.41±0.04  |
| PLL <sub>n</sub>       | 0.05±0.00  | 0.22±0.01     | 0.10±0.00      | 0.39±0.01  |
| OLL+OLPo               | 2.91±0.09  | 35.79±0.73    | 20.67±0.33     | 0.34±0.01  |
| OOL <sub>n</sub>       | 1.11±0.02  | 0.14±0.00     | 0.80±0.01      | 0.17±0.00  |
| PLL                    | 0.98±0.01  | 0.23±0.00     | 0.16±0.00      | 0.06±0.00  |
| OOL+PoOO               | 0.56±0.02  | 0.17±0.00     | 0.19±0.00      | 0.03±0.00  |
| OOL+LnPP               | 14.85±0.38 | 26.97±0.86    | 14.08±0.34     | 2.21±0.05  |
| OOPo                   | 0.82±0.03  | 0.36±0.01     | 0.00±0.00      | 12.43±0.32 |
| PLO+SLL                | 8.13±0.28  | 10.92±0.19    | 26.97±0.81     | 0.54±0.02  |
| PoOP                   | 0.44±0.01  | 0.26±0.00     | 0.00±0.00      | 10.70±0.22 |
| PPL                    | 1.17±0.02  | 0.08±0.00     | 0.56±0.02      | 0.17±0.00  |
| OOO                    | 35.22±0.99 | 7.39±0.19     | 4.10±0.04      | 4.79±0.09  |
| OOP                    | 25.05±0.61 | 11.50±0.20    | 15.13±0.30     | 28.39±0.50 |
| POP                    | 4.31±0.07  | 1.03±0.02     | 8.96±0.15      | 33.28±0.71 |
| SOO                    | 4.81±0.13  | 3.85±0.11     | 3.29±0.13      | 0.49±0.01  |
| POS                    | 0.00±0.00  | 0.98±0.03     | 4.26±0.14      | 2.14±0.06  |
| ΔECN42                 | 0.06±0.02  | 30.57±1.05    | 16.31±0.18     | 3.12±0.02  |

Table 3. Sterol compositions of VOO, sunflower oil, cottonseed oil and palm olein samples

|                          | VOO        | Sunflower oil | Cottonseed oil | Palm olein |
|--------------------------|------------|---------------|----------------|------------|
| Cholesterol              | 0.05±0.00  | 0.13±0.00     | 0.35±0.01      | 3.38±0.11  |
| brassicasterol           | 0.02±0.00  | 0.02±0.00     | 0.06±0.00      | 0.07±0.00  |
| ergosterol               | 0.03±0.00  | 0.00±0.00     | 0.00±0.00      | 0.00±0.00  |
| 24-methylene-cholesterol | 0.06±0.00  | 0.00±0.00     | 0.00±0.00      | 0.00±0.00  |
| campesterol              | 3.29±0.05  | 10.25±0.29    | 7.71±0.19      | 21.70±0.27 |
| campestanol              | 0.01±0.00  | 0.00±0.00     | 0.00±0.00      | 0.00±0.00  |
| stigmasterol             | 0.35±0.00  | 7.15±0.03     | 1.01±0.02      | 12.61±0.16 |
| Δ5.23-stigmastadienol    | 0.06±0.00  | 0.00±0.00     | 0.00±0.00      | 0.00±0.00  |
| clerosterol              | 0.77±0.02  | 0.55±0.01     | 0.90±0.01      | 0.00±0.00  |
| β-sitosterol             | 81.23±0.97 | 59.41±1.46    | 87.02±0.81     | 57.90±1.52 |
| sitostanol               | 1.19±0.02  | 0.00±0.00     | 0.00±0.00      | 0.00±0.00  |
| Δ5-avenasterol           | 10.10±0.36 | 1.39±0.02     | 1.08±0.02      | 0.91±0.02  |
| Δ5.24-stigmastadienol    | 0.43±0.00  | 1.65±0.05     | 0.18±0.00      | 1.09±0.01  |
| Apparent β-sitosterol    | 93.77±1.11 | 63.00±1.45    | 89.18±0.82     | 59.90±1.54 |
| Δ7-stigmastenol          | 0.24±0.00  | 11.71±0.25    | 0.06±0.00      | 0.79±0.02  |
| Δ7-avenasterol           | 0.33±0.01  | 6.68±0.13     | 0.25±0.01      | 0.96±0.02  |
| eritrodiol               | 1.24±0.05  | 0.00±0.00     | 0.00±0.00      | 0.00±0.00  |
| Uvaol                    | 0.05±0.00  | 0.00±0.00     | 0.00±0.00      | 0.00±0.00  |

The characteristic triglyceride trilinolein (LLL) is as low as 0.16% and 0.13% in VOO and sunflower oil, respectively. The highest total value of OLL+OLPo triglycerides was measured in sunflower oil at 35.79%, followed by cotton oil at 20.67%. OOL+LnPP total has differed between

2.21% (palm olein) and 26.97% (sunflower oil). Palm olein has the highest OOPo triglyceride content at 12.43%. On the contrary, palm olein oil has the lowest content of PLO+SLLL triglycerides compared to other vegetable oils. The PoOP was not detected in cottonseed oil,

while palm olein had 10.70%. It is known that the major characteristic triglyceride of VOO is triolein (OOO) (Ben Hmida et al., 2022). Similarly, in our study, VOO had 35.22% of OOO. Again, OOP levels, one of the triglycerides rich in oleic acid, were high in VOO and palm olein oil.

Phytosterols constitute a significant part of the unsaponifiable fraction of oils and the sterol composition shapes during the maturation of the olive (Bozdogan Konuskan and Mungan, 2016). The hydrolytic and oxidative progress may affect the fatty acid composition. Therefore, the sterol composition of vegetable oil act as a fingerprint and is more reliable in the assessment of adulteration than fatty acid composition (Aloisi et al., 2020; Saygın Gümüşkesen and Yemişçiöglü, 2010). The sterol composition of VOO, sunflower oil, cottonseed oil and palm olein samples were given in Table 3. VOO has low content of campesterol and stigmaterol. The highest amount of sterol in VOO was  $\beta$ -sitosterol with 81.23%, while it was determined at 87.02% in cottonseed oil. The  $\beta$ -sitosterol level was relatively low in sunflower oil and palm olein (59.41% and 57.90%, respectively).  $\Delta$ 5-avenasterol was highest in VOO at 10.10%. According to the Codex Alimentarius, apparent  $\beta$ -sitosterol which is the sum of  $\Delta$ 5,23-stigmastadienol, clerosterol,  $\beta$ -sitosterol, sitostanol,  $\Delta$ 5-avenasterol and  $\Delta$ 5,24-stigmastadienol should be higher than 93% for VOO. The apparent  $\beta$ -sitosterol content of VOO was 93.77% in our study.

#### **The differences in chemical properties of adulterated samples and detection using $\Delta$ ECN42 and sterol composition**

Table 4 depicts the fatty acid composition of the adulterated samples prepared by mixing refined sunflower oil, cottonseed oil and palm olein with 1%, 4%, 7%, 10% and 13%. Palm olein was richer in C16:0 fatty acid at 41.47%, compared to VOO at 13.78%. Therefore, the adulterated samples with palm olein had higher C16:0 content even at 1% concentration. It was determined that as the

palm olein concentration of the adulterated sample increased, C16:0 fatty acid content gradually increased to 15.21%, 16.13%, 17.29% and 18.17%. Since the C16:0 content of sunflower oil was lower than the VOO, the C16:0 content of adulterated samples with sunflower oil decreased gradually to 14.17, 13.55, 13.50, 12.97 and 12.81%. Similarly, Dourtoglou et al. (2003) stated that the C16:0 content was reduced when VOO was adulterated with sunflower oil. This study also reported an increase in C16:0 content when VOO was adulterated with cottonseed oil. Another distinctive change was in C18:1, the major fatty acid of VOO (Dourtoglou et al., 2003). The percentages of C18:1 decreased as the amount of sunflower oil in adulterated samples increased. As the percentage of adulteration with sunflower oil increased, C18:2 content gradually increased to 12.34%, 13.64%, 15.69%, 17.54% and 19.69%. Similarly, C18:2 content increased as the percentage of adulteration with cottonseed oil increased. The sterol compositions of adulterated samples using cottonseed, palm olein, and sunflower oil are shown in Table 5. Stigmaterol levels of adulterated samples have increased as the percentage of adulteration has risen. Along with the increase in the adulteration proportion, the campesterol content also elevated. The campesterol contents of; SOVO10, SOVO13, CSVO10, CSVO13, and POVO13 were, respectively, 4.09%, 4.37%, 4.11%, 4.16%, and 4.22% were lied outside of the codex limits. The campesterol decision tree approach should be applied when the sample's campesterol percentage is between 4% and 4.5%, per European Union's olive oil requirements (Anonymous, 2022). According to this decision tree,  $\Delta$ 7-stigmastanol should be  $\leq$  0.3% and stigmaterol should be  $\leq$  1.4% to decide the sample is not adulterated. The stigmaterol percentages of the samples were lower than 1.4%, but the  $\Delta$ 7-stigmastanol values of some samples were greater than 0.3% (Table 5). Therefore, only those with a 10% and 13% mixture ratio among the adulterated samples could be determined using the campesterol decision tree.

## Detecting virgin olive oil adulteration: Sterols, ECN42, and FTIR compared

Table 4. Fatty acid compositions of adulterated samples

|       | SOVO            |                 |                 |                 |                 | CSVO            |                 |                 |                 |                 | POVO            |                 |                 |                 |                 |
|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|       | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             |
| C14:0 | 0.04<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.04<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.07<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.07<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.14<br>(0.00)  | 0.17<br>(0.01)  |
| C16:0 | 14.17<br>(0.30) | 13.55<br>(0.55) | 13.50<br>(0.29) | 12.97<br>(0.46) | 12.81<br>(0.33) | 13.97<br>(0.22) | 13.91<br>(0.23) | 14.92<br>(0.30) | 14.61<br>(0.24) | 14.72<br>(0.30) | 14.00<br>(0.27) | 15.21<br>(0.20) | 16.13<br>(0.41) | 17.29<br>(0.38) | 18.17<br>(0.56) |
| C16:1 | 0.81<br>(0.02)  | 0.87<br>(0.02)  | 0.86<br>(0.03)  | 0.81<br>(0.01)  | 0.78<br>(0.03)  | 0.91<br>(0.02)  | 0.90<br>(0.02)  | 0.88<br>(0.02)  | 0.88<br>(0.03)  | 0.85<br>(0.03)  | 0.84<br>(0.03)  | 0.87<br>(0.02)  | 0.85<br>(0.03)  | 0.86<br>(0.02)  | 0.82<br>(0.02)  |
| C17:0 | 0.16<br>(0.01)  | 0.15<br>(0.00)  | 0.16<br>(0.00)  | 0.16<br>(0.00)  | 0.14<br>(0.00)  | 0.17<br>(0.00)  | 0.15<br>(0.01)  | 0.15<br>(0.00)  | 0.16<br>(0.00)  | 0.15<br>(0.01)  | 0.16<br>(0.01)  | 0.16<br>(0.00)  | 0.16<br>(0.00)  | 0.16<br>(0.00)  | 0.14<br>(0.00)  |
| C17:1 | 0.25<br>(0.01)  | 0.23<br>(0.01)  | 0.23<br>(0.00)  | 0.23<br>(0.00)  | 0.21<br>(0.01)  | 0.26<br>(0.01)  | 0.24<br>(0.00)  | 0.23<br>(0.01)  | 0.23<br>(0.00)  | 0.22<br>(0.01)  | 0.25<br>(0.01)  | 0.24<br>(0.01)  | 0.23<br>(0.00)  | 0.21<br>(0.00)  | 0.21<br>(0.01)  |
| C18:0 | 2.87<br>(0.07)  | 2.86<br>(0.06)  | 2.87<br>(0.11)  | 2.99<br>(0.05)  | 2.97<br>(0.11)  | 2.82<br>(0.03)  | 2.79<br>(0.06)  | 2.81<br>(0.05)  | 2.76<br>(0.11)  | 2.76<br>(0.10)  | 2.75<br>(0.04)  | 2.96<br>(0.07)  | 2.92<br>(0.09)  | 2.92<br>(0.07)  | 2.95<br>(0.08)  |
| C18:1 | 68.39<br>(0.84) | 66.79<br>(1.66) | 64.65<br>(1.38) | 62.59<br>(1.81) | 61.73<br>(2.11) | 67.86<br>(1.88) | 67.36<br>(0.44) | 64.91<br>(1.01) | 63.86<br>(1.95) | 61.96<br>(1.32) | 69.09<br>(2.05) | 66.81<br>(1.90) | 69.05<br>(1.30) | 66.60<br>(2.03) | 64.51<br>(0.94) |
| C18:2 | 12.34<br>(0.37) | 13.64<br>(0.43) | 15.69<br>(0.42) | 17.54<br>(0.41) | 19.69<br>(0.38) | 11.91<br>(0.27) | 12.96<br>(0.35) | 14.79<br>(0.47) | 16.08<br>(0.42) | 17.63<br>(0.59) | 10.88<br>(0.21) | 11.04<br>(0.27) | 11.28<br>(0.23) | 11.10<br>(0.39) | 10.97<br>(0.27) |
| C20:0 | 0.41<br>(0.01)  | 0.42<br>(0.02)  | 0.42<br>(0.01)  | 0.39<br>(0.01)  | 0.39<br>(0.01)  | 0.40<br>(0.01)  | 0.42<br>(0.01)  | 0.41<br>(0.01)  | 0.39<br>(0.01)  | 0.36<br>(0.01)  | 0.36<br>(0.01)  | 0.43<br>(0.00)  | 0.43<br>(0.01)  | 0.41<br>(0.01)  | 0.43<br>(0.02)  |
| C18:3 | 0.69<br>(0.01)  | 0.63<br>(0.01)  | 0.64<br>(0.01)  | 0.60<br>(0.02)  | 0.61<br>(0.01)  | 0.70<br>(0.02)  | 0.66<br>(0.02)  | 0.63<br>(0.01)  | 0.62<br>(0.01)  | 0.62<br>(0.02)  | 0.61<br>(0.02)  | 0.66<br>(0.01)  | 0.66<br>(0.02)  | 0.62<br>(0.01)  | 0.61<br>(0.01)  |
| C20:1 | 0.27<br>(0.00)  | 0.26<br>(0.00)  | 0.26<br>(0.01)  | 0.26<br>(0.00)  | 0.26<br>(0.00)  | 0.29<br>(0.01)  | 0.26<br>(0.00)  | 0.25<br>(0.01)  | 0.24<br>(0.00)  | 0.23<br>(0.01)  | 0.24<br>(0.01)  | 0.27<br>(0.01)  | 0.27<br>(0.01)  | 0.26<br>(0.00)  | 0.25<br>(0.01)  |
| C22:0 | 0.12<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.14<br>(0.00)  | 0.16<br>(0.01)  | 0.17<br>(0.01)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.11<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  |
| C24:0 | 0.05<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.04<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.04<br>(0.00)  |

Table 5. Sterol compositions of adulterated samples

|            | SOVO            |                 |                 |                 | CSVO            |                 |                 |                 | POVO            |                 |                 |                 |                 |                 |                 |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|            | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             |
| k.terol    | 0.23<br>(0.01)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.08<br>(0.00)  | 0.08<br>(0.00)  | 0.07<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.08<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.11<br>(0.00)  | 0.14<br>(0.00)  | 0.08<br>(0.00)  | 0.04<br>(0.00)  | 0.25<br>(0.01)  |
| b.sterol   | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.00<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.00<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  |
| e.sterol   | 0.04<br>(0.00)  | 0.04<br>(0.00)  | 0.04<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.04<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.89<br>(0.03)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 1.08<br>(0.04)  | 0.06<br>(0.00)  |
| 24m.k.strl | 0.09<br>(0.00)  | 0.08<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.08<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.06<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.08<br>(0.00)  | 0.07<br>(0.00)  | 0.18<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  |
| kmpsterol  | 3.62<br>(0.05)  | 4.00<br>(0.03)  | 3.98<br>(0.02)  | 4.09<br>(0.09)  | 4.37<br>(0.09)  | 3.55<br>(0.08)  | 3.79<br>(0.05)  | 3.81<br>(0.04)  | 4.11<br>(0.09)  | 4.16<br>(0.10)  | 2.53<br>(0.06)  | 3.74<br>(0.16)  | 3.95<br>(0.06)  | 3.14<br>(0.04)  | 4.22<br>(0.11)  |
| kmpstanol  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.07<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.05<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.00<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.00<br>(0.00)  | 0.00<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  |
| stg.sterol | 0.56<br>(0.01)  | 0.70<br>(0.02)  | 0.89<br>(0.03)  | 1.02<br>(0.01)  | 1.31<br>(0.02)  | 0.37<br>(0.01)  | 0.41<br>(0.01)  | 0.40<br>(0.01)  | 0.43<br>(0.01)  | 0.44<br>(0.01)  | 0.44<br>(0.01)  | 0.53<br>(0.00)  | 0.57<br>(0.02)  | 0.92<br>(0.01)  | 0.97<br>(0.02)  |
| Δ5,23      | 0.14<br>(0.00)  | 0.28<br>(0.01)  | 0.33<br>(0.00)  | 0.36<br>(0.01)  | 0.51<br>(0.00)  | 0.11<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 1.51<br>(0.03)  | 0.24<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.00<br>(0.00)  |
| kleres     | 0.91<br>(0.02)  | 0.91<br>(0.02)  | 0.67<br>(0.01)  | 0.64<br>(0.01)  | 0.79<br>(0.03)  | 0.94<br>(0.03)  | 0.86<br>(0.02)  | 0.71<br>(0.02)  | 0.45<br>(0.01)  | 0.63<br>(0.02)  | 0.55<br>(0.01)  | 0.86<br>(0.02)  | 0.72<br>(0.02)  | 0.40<br>(0.01)  | 0.84<br>(0.03)  |
| βs.sterol  | 80.80<br>(1.86) | 81.71<br>(1.91) | 76.82<br>(2.57) | 77.71<br>(2.27) | 74.83<br>(1.86) | 80.49<br>(2.57) | 81.66<br>(1.24) | 81.16<br>(2.47) | 80.09<br>(0.66) | 81.06<br>(2.42) | 83.12<br>(2.21) | 81.25<br>(2.30) | 81.14<br>(2.11) | 81.82<br>(1.39) | 79.84<br>(1.19) |
| s.stanol   | 1.34<br>(0.02)  | 1.02<br>(0.01)  | 1.42<br>(0.07)  | 1.42<br>(0.05)  | 1.61<br>(0.05)  | 1.39<br>(0.05)  | 1.29<br>(0.04)  | 1.28<br>(0.03)  | 1.40<br>(0.03)  | 1.99<br>(0.06)  | 0.53<br>(0.01)  | 0.95<br>(0.02)  | 0.72<br>(0.00)  | 0.84<br>(0.03)  | 1.39<br>(0.03)  |
| Δ5avena    | 9.08<br>(0.23)  | 9.39<br>(0.18)  | 11.28<br>(0.30) | 10.96<br>(0.33) | 11.22<br>(0.31) | 9.42<br>(0.16)  | 9.07<br>(0.21)  | 9.72<br>(0.06)  | 8.92<br>(0.12)  | 8.97<br>(0.08)  | 6.87<br>(0.16)  | 8.68<br>(0.25)  | 8.72<br>(0.22)  | 6.99<br>(0.07)  | 8.83<br>(0.19)  |
| Δ5,24      | 0.86<br>(0.02)  | 0.79<br>(0.03)  | 0.88<br>(0.02)  | 0.72<br>(0.02)  | 0.85<br>(0.01)  | 0.89<br>(0.03)  | 0.76<br>(0.019) | 0.68<br>(0.01)  | 0.65<br>(0.01)  | 0.64<br>(0.02)  | 0.59<br>(0.01)  | 0.82<br>(0.00)  | 0.96<br>(0.01)  | 0.62<br>(0.01)  | 0.91<br>(0.02)  |
| Σβs.sterol | 93.13<br>(1.65) | 94.09<br>(1.95) | 91.41<br>(2.35) | 91.81<br>(2.08) | 89.81<br>(2.13) | 93.24<br>(2.65) | 93.72<br>(1.35) | 93.64<br>(2.54) | 93.02<br>(0.58) | 93.52<br>(2.33) | 91.67<br>(2.33) | 92.58<br>(2.54) | 92.26<br>(2.19) | 90.67<br>(1.41) | 91.81<br>(1.06) |
| Δ7stig     | 0.38<br>(0.01)  | 0.44<br>(0.01)  | 0.48<br>(0.02)  | 0.43<br>(0.02)  | 0.56<br>(0.01)  | 0.47<br>(0.01)  | 0.49<br>(0.01)  | 0.54<br>(0.02)  | 0.45<br>(0.02)  | 0.57<br>(0.02)  | 0.29<br>(0.00)  | 0.47<br>(0.02)  | 0.42<br>(0.02)  | 0.34<br>(0.01)  | 0.55<br>(0.01)  |
| Δ7avena    | 0.68<br>(0.02)  | 0.86<br>(0.01)  | 1.34<br>(0.05)  | 1.58<br>(0.04)  | 2.35<br>(0.05)  | 0.38<br>(0.01)  | 0.35<br>(0.01)  | 0.32<br>(0.01)  | 0.32<br>(0.01)  | 0.31<br>(0.01)  | 0.32<br>(0.01)  | 0.41<br>(0.00)  | 0.40<br>(0.01)  | 0.35<br>(0.01)  | 0.37<br>(0.01)  |
| erit       | 1.45<br>(0.03)  | 1.34<br>(0.03)  | 1.20<br>(0.03)  | 1.22<br>(0.02)  | 1.28<br>(0.03)  | 1.39<br>(0.02)  | 1.42<br>(0.05)  | 1.68<br>(0.05)  | 1.63<br>(0.04)  | 1.67<br>(0.02)  | 1.63<br>(0.06)  | 1.65<br>(0.01)  | 1.66<br>(0.04)  | 1.44<br>(0.02)  | 1.54<br>(0.04)  |
| uva        | 0.02<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  | 0.01<br>(0.00)  | 0.03<br>(0.00)  | 0.02<br>(0.00)  |

k.terol: kolesterol, b.sterol: brassikasterol, e.sterol: ergosterol, 24m.k.strl: 24-metilen-kolesterol, kmpsterol: kampesterol, kmpstanol: kampestanol, stg.sterol: stigmasterol, Δ5,23: delta-5.23-stigmastadienol, kleres: kleresterol, βs.sterol: beta-sitosterol, s.stanol: sitostanol, Δ5avena: delta-5-avenasterol, Δ5,24: delta-5.24-stigmastadienol, Σβs.sterol: apparent b-sitosterol, Δ7stig: delta-7-stigmastenol, Δ7avena: delta-7-avenasterol, erit: eritriodiol, uva: uvaol.

Table 5 depicts that stigmaterol percentages increase as the percentage of adulteration increases for all adulterated samples. However, since the campesterol percentage of all adulterated samples is higher than the stigmaterol percentage, all adulterated samples comply with the purity criteria specified in the relevant codex. Similarly, it was observed that all adulterated samples' cholesterol and brassicasterol values were within the limits of VOO specified in the relevant regulation. When  $\Delta 7$ -stigmastanol amounts are considered, it is seen that only 13% of adulteration ratios were detected among all adulterated samples. Similarly, Jabeur et al. (2014) determined that a 10% sunflower oil mixture is required for the samples to be out of standard with the increase in  $\Delta 7$ -stigmastanol in VOO adulteration (Jabeur et al., 2014). Apparent  $\beta$ -sitosterol contents of the samples adulterated with sunflower oil were determined as 91.41, 91.81 and 89.81% at 7-10-13% adulteration rates, respectively. Thus, the adulterated samples containing 7% or more sunflower oil remained outside the limits. Apparent  $\beta$ -sitosterol contents of all samples adulterated with palm olein were found out of the limit according to the relevant communiqué. Still, it was observed that the apparent  $\beta$ -sitosterol contents of none of the adulterated samples containing cottonseed oil were out of this limit.

The  $\Delta$ ECN42 is an important parameter used to detect VOO adulteration. Actual ECN42 triglyceride content (LLL + OLnL + PLnL) was higher in all refined adulterants than in VOO samples. The limit in  $\Delta$ ECN42 is 0.20 for VOO and 0.30 for lampante and refined olive oil (Anonymous, 2017). The  $\Delta$ ECN42 value, characterized by the detection of the adulteration of seed oils in olive oil, was measured in olive oil with 0.06 in this study. The  $\Delta$ ECN42 value was determined as 30.57 in sunflower oil and 16.31 in cottonseed oil, and 3.12 in palm olein oil in this study. Table 6 shows the triglyceride composition of adulterated samples with sunflower oil, cottonseed oil, and palm olein. LLL values increased with the increase in adulteration rate for all samples. OLL+OLPo percentages increased as the adulteration rate of cotton oil and sunflower

oil increased. OOO tended to decrease as the percentage of adulteration increased. The  $\Delta$ ECN42 value enabled the detection of adulteration in all samples except the one having 1% cottonseed oil. Jabeur et al. (2014) stated that adulterated VOO samples containing 1% sunflower oil, 3% soybean oil and 3% corn oil using  $\Delta$ ECN42 values could be detected (Jabeur et al., 2014).

#### **Discrimination of adulterated samples according to LDA performed using FTIR data**

Infrared spectroscopy exploits the fact that molecules absorb frequencies characteristic of their molecular structure. These absorptions are resonant frequencies, i.e., the absorbed radiation's frequency matches a molecule's vibrational frequency. The atoms in organic compounds can vibrate in nine ways; symmetric and antisymmetric stretching, scissoring, rocking, wagging and twisting. The range of  $1500\text{cm}^{-1}$  to  $650\text{cm}^{-1}$  is specified as the "fingerprint" region of the FTIR spectra of vegetable oils, where vibrational modes of the organic compounds of vegetable oil significantly affect the spectral shape in this region (Movasaghi et al., 2008; Squeo et al., 2019).

For instance,  $1464\text{--}983\text{cm}^{-1}$  region is assigned to bending vibrations of  $-\text{CH}_2$  and  $-\text{CH}_3$  aliphatic groups and rocking vibrations. Symmetric H-C-H bending at  $1377\text{ cm}^{-1}$  could be attributed to glycerol group O- $\text{CH}_2$  (mono-, di- and triglycerides).  $\text{CH}_2$  scissoring are observed at  $1462\text{ cm}^{-1}$  whereas band between  $1125$  and  $1095\text{ cm}^{-1}$  depend on the stretching vibration of C=O ester groups and  $-\text{CH}_2$  wagging. The last major peak located near  $723\text{ cm}^{-1}$  could be associated with overlapping of the  $(\text{CH}_2)_n$  rocking vibration and out-of-plane vibration ( $-\text{CH}$  wagging) of cis-disubstituted olefins (Uncu et al., 2019). In addition, as used in the AOCS Official Method 14-61, the trans-isomer content can be reached through the peak structure of  $966\text{cm}^{-1}$ .

Figure 1 presents the FTIR spectra of adulteration samples prepared with sunflower, palm olein and cotton oils, pure oils and VOO, respectively, in

untreated form. In particular, the morphological similarity of the fingerprint regions in the FTIR spectra of palm olein and VOO given in Figure 1b is remarkable. Some deviations and differences can be seen in the fingerprint region in the FTIR spectra of sunflower oil and VOO given in Figure 1a and cotton oil and natural olive oil given in Figure 1c. LDA was applied after this spectrum data were pre-processed as explained under the title of material and method.

Figure 2 depicts the LDA results of adulterated olive oil samples obtained with sunflower, palm olein and cotton oils and their blends (1-4-7-10-13%) of the selected VOO sample. When the LDA graph of VOO and sunflower oil mixtures was examined (Figure 1a), it was seen that the first two functions obtained at the end of LDA explain the difference between the samples at a total rate of 92.1%. It has been determined that the VOO and sunflower oil are separated on the first function. The adulteration samples prepared with these two oils show a distribution between VOO and sunflower oil on the graph, depending on the

sunflower oil content. The LDA graph shows that even the adulteration sample containing 1% of sunflower oil can be easily separated from the VOO sample.

The LDA graph showing the separation of adulterated samples prepared with palm olein from VOO is given in Figure 2b. According to the LDA results, the first two functions explained the difference between the sample groups at the rate of 94.9%. Although adulterated samples containing sunflower oil were effectively separated on the LDA graph, it was observed that VOO and palm olein samples overlapped on the LDA graph, especially adulteration samples containing 10% and 13% palm olein could not be separated from VOO. For this reason, it is thought that the differences seen in samples with lower palm olein content are not justifiable. This result means that the fingerprint region in the FTIR spectra does not provide sufficient information for the detection of olive oil adulteration with palm olein.

Table 6. Triglyceride compositions and  $\Delta$ ECN42 values of adulterated samples

|                | SOVO            |                 |                 |                 |                 | CSVO            |                 |                 |                 |                 | POVO            |                 |                 |                 |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             | 1%              | 4%              | 7%              | 10%             | 13%             |
| LLL            | 0.76<br>(0.01)  | 1.88<br>(0.05)  | 3.13<br>(0.09)  | 4.43<br>(0.08)  | 5.42<br>(0.14)  | 0.44<br>(0.01)  | 1.27<br>(0.02)  | 1.83<br>(0.06)  | 2.33<br>(0.04)  | 3.08<br>(0.05)  | 0.25<br>(0.01)  | 0.30<br>(0.01)  | 0.26<br>(0.01)  | 0.24<br>(0.00)  | 0.16<br>(0.01)  |
| OLLn           | 0.37<br>(0.00)  | 0.28<br>(0.01)  | 0.25<br>(0.01)  | 0.31<br>(0.00)  | 0.33<br>(0.01)  | 0.21<br>(0.01)  | 0.51<br>(0.02)  | 0.28<br>(0.00)  | 0.19<br>(0.00)  | 0.25<br>(0.01)  | 0.44<br>(0.02)  | 0.57<br>(0.01)  | 0.56<br>(0.01)  | 0.57<br>(0.01)  | 0.65<br>(0.00)  |
| +PoLL          | 0.11<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.07<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.09<br>(0.00)  | 0.29<br>(0.01)  | 0.04<br>(0.00)  | 0.13<br>(0.00)  | 0.36<br>(0.01)  | 0.12<br>(0.00)  | 0.23<br>(0.01)  | 0.07<br>(0.00)  | 0.10<br>(0.00)  | 0.23<br>(0.00)  |
| PLLn           | 3.22<br>(0.05)  | 4.12<br>(0.09)  | 5.07<br>(0.15)  | 5.94<br>(0.16)  | 6.71<br>(0.16)  | 3.07<br>(0.07)  | 3.61<br>(0.10)  | 4.13<br>(0.08)  | 4.41<br>(0.07)  | 4.84<br>(0.13)  | 2.95<br>(0.04)  | 2.97<br>(0.05)  | 3.03<br>(0.05)  | 2.79<br>(0.07)  | 2.56<br>(0.04)  |
| OLPo           | 1.16<br>(0.03)  | 1.27<br>(0.03)  | 1.06<br>(0.02)  | 0.95<br>(0.02)  | 1.04<br>(0.03)  | 1.36<br>(0.05)  | 1.32<br>(0.04)  | 1.22<br>(0.02)  | 1.25<br>(0.03)  | 1.15<br>(0.03)  | 1.23<br>(0.04)  | 1.31<br>(0.03)  | 1.04<br>(0.02)  | 1.24<br>(0.04)  | 0.98<br>(0.02)  |
| OOLn           | 1.12<br>(0.02)  | 1.56<br>(0.04)  | 1.75<br>(0.03)  | 2.08<br>(0.04)  | 2.49<br>(0.06)  | 1.51<br>(0.05)  | 2.27<br>(0.04)  | 2.98<br>(0.13)  | 3.92<br>(0.13)  | 4.96<br>(0.10)  | 0.95<br>(0.03)  | 1.11<br>(0.03)  | 1.07<br>(0.02)  | 1.21<br>(0.03)  | 0.92<br>(0.00)  |
| OLL+           | 0.54<br>(0.01)  | 0.63<br>(0.02)  | 0.54<br>(0.02)  | 0.42<br>(0.01)  | 0.40<br>(0.01)  | 0.90<br>(0.01)  | 0.60<br>(0.01)  | 0.59<br>(0.01)  | 1.18<br>(0.03)  | 0.62<br>(0.02)  | 0.69<br>(0.01)  | 0.56<br>(0.01)  | 0.69<br>(0.02)  | 0.76<br>(0.02)  | 0.35<br>(0.00)  |
| OOL+           | 14.82<br>(0.23) | 14.77<br>(0.29) | 14.55<br>(0.24) | 14.14<br>(0.37) | 13.67<br>(0.28) | 15.11<br>(0.53) | 14.42<br>(0.19) | 14.64<br>(0.47) | 13.92<br>(0.36) | 13.92<br>(0.45) | 14.86<br>(0.39) | 14.90<br>(0.37) | 14.19<br>(0.26) | 14.08<br>(0.35) | 13.60<br>(0.29) |
| LnPP           | 1.16<br>(0.03)  | 0.77<br>(0.02)  | 0.85<br>(0.01)  | 0.64<br>(0.01)  | 0.82<br>(0.01)  | 0.85<br>(0.01)  | 0.73<br>(0.02)  | 0.75<br>(0.02)  | 0.74<br>(0.02)  | 0.82<br>(0.02)  | 0.91<br>(0.02)  | 0.83<br>(0.02)  | 0.76<br>(0.02)  | 0.61<br>(0.02)  | 0.84<br>(0.02)  |
| OOPo           | 8.15<br>(0.18)  | 8.02<br>(0.27)  | 8.57<br>(0.14)  | 8.55<br>(0.03)  | 8.59<br>(0.11)  | 8.14<br>(0.19)  | 8.41<br>(0.24)  | 8.56<br>(0.16)  | 9.01<br>(0.18)  | 9.19<br>(0.16)  | 7.99<br>(0.19)  | 8.55<br>(0.21)  | 8.42<br>(0.10)  | 8.46<br>(0.16)  | 9.36<br>(0.17)  |
| PLO+           | 0.72<br>(0.01)  | 0.42<br>(0.01)  | 0.48<br>(0.02)  | 0.33<br>(0.00)  | 0.40<br>(0.01)  | 0.44<br>(0.01)  | 0.48<br>(0.02)  | 0.30<br>(0.01)  | 0.41<br>(0.01)  | 0.42<br>(0.01)  | 0.50<br>(0.01)  | 0.57<br>(0.02)  | 0.41<br>(0.01)  | 0.57<br>(0.03)  | 0.44<br>(0.01)  |
| PoOP           | 1.08<br>(0.04)  | 0.93<br>(0.02)  | 0.95<br>(0.02)  | 0.96<br>(0.03)  | 0.99<br>(0.01)  | 0.98<br>(0.02)  | 1.36<br>(0.02)  | 1.45<br>(0.06)  | 1.78<br>(0.04)  | 2.02<br>(0.04)  | 1.09<br>(0.03)  | 1.10<br>(0.03)  | 1.36<br>(0.03)  | 2.02<br>(0.08)  | 2.03<br>(0.03)  |
| PPL            | 33.96<br>(0.74) | 33.04<br>(0.67) | 31.87<br>(0.61) | 31.78<br>(0.93) | 29.59<br>(0.70) | 34.17<br>(0.86) | 33.27<br>(0.81) | 32.85<br>(0.81) | 31.01<br>(0.75) | 30.64<br>(0.88) | 34.36<br>(0.96) | 34.12<br>(0.51) | 34.53<br>(1.03) | 32.31<br>(1.06) | 31.60<br>(0.81) |
| OOO            | 23.35<br>(0.33) | 22.94<br>(0.52) | 22.98<br>(0.65) | 22.06<br>(0.58) | 21.09<br>(0.44) | 23.99<br>(0.71) | 23.24<br>(0.46) | 23.37<br>(0.87) | 22.14<br>(0.48) | 21.59<br>(0.58) | 24.55<br>(0.52) | 25.41<br>(0.40) | 25.14<br>(0.74) | 24.70<br>(0.90) | 25.63<br>(0.74) |
| OOP            | 3.71<br>(0.10)  | 3.17<br>(0.13)  | 3.27<br>(0.09)  | 3.30<br>(0.08)  | 3.17<br>(0.03)  | 3.78<br>(0.06)  | 3.14<br>(0.06)  | 3.40<br>(0.07)  | 3.57<br>(0.04)  | 3.98<br>(0.10)  | 3.75<br>(0.10)  | 4.43<br>(0.08)  | 5.39<br>(0.11)  | 6.67<br>(0.07)  | 6.87<br>(0.25)  |
| POP            | 4.77<br>(0.18)  | 4.74<br>(0.14)  | 4.23<br>(0.08)  | 4.07<br>(0.07)  | 4.05<br>(0.11)  | 4.14<br>(0.11)  | 4.48<br>(0.05)  | 4.01<br>(0.06)  | 3.70<br>(0.07)  | 2.97<br>(0.10)  | 4.13<br>(0.11)  | 3.23<br>(0.13)  | 3.48<br>(0.09)  | 3.37<br>(0.02)  | 3.70<br>(0.06)  |
| SOO            | 0.56<br>(0.03)  | 1.48<br>(0.05)  | 2.48<br>(0.10)  | 3.66<br>(0.09)  | 4.40<br>(0.06)  | 0.06<br>(0.00)  | 1.34<br>(0.00)  | 1.29<br>(0.06)  | 1.66<br>(0.03)  | 2.52<br>(0.10)  | 0.27<br>(0.01)  | 0.52<br>(0.01)  | 0.34<br>(0.01)  | 0.37<br>(0.03)  | 0.51<br>(0.01)  |
| $\Delta$ ECN42 | 0.56<br>(0.03)  | 1.48<br>(0.05)  | 2.48<br>(0.10)  | 3.66<br>(0.09)  | 4.40<br>(0.06)  | 0.06<br>(0.00)  | 1.34<br>(0.00)  | 1.29<br>(0.06)  | 1.66<br>(0.03)  | 2.52<br>(0.10)  | 0.27<br>(0.01)  | 0.52<br>(0.01)  | 0.34<br>(0.01)  | 0.37<br>(0.03)  | 0.51<br>(0.01)  |

P: Palmitic acid, Po:Palmitoleic acid, S: Stearic acid, O: Oleic acid, L: Linoleic acid, Ln: Linolenic acid,

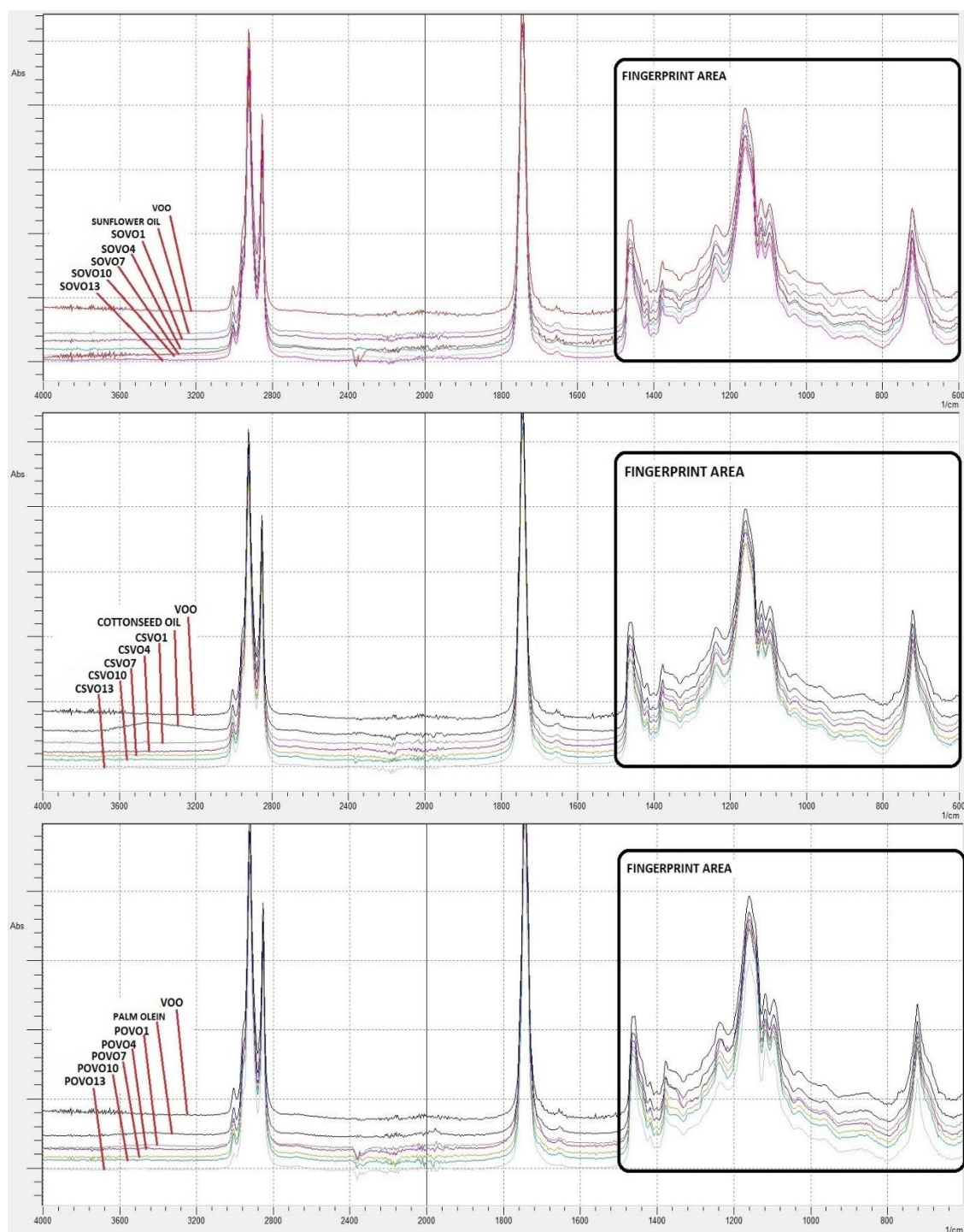


Figure 1. The untreated FTIR spectra between 4000cm<sup>-1</sup> and 600cm<sup>-1</sup> of pure and adulterated samples. VOO: Selected VOO for adulterated sample preparations.



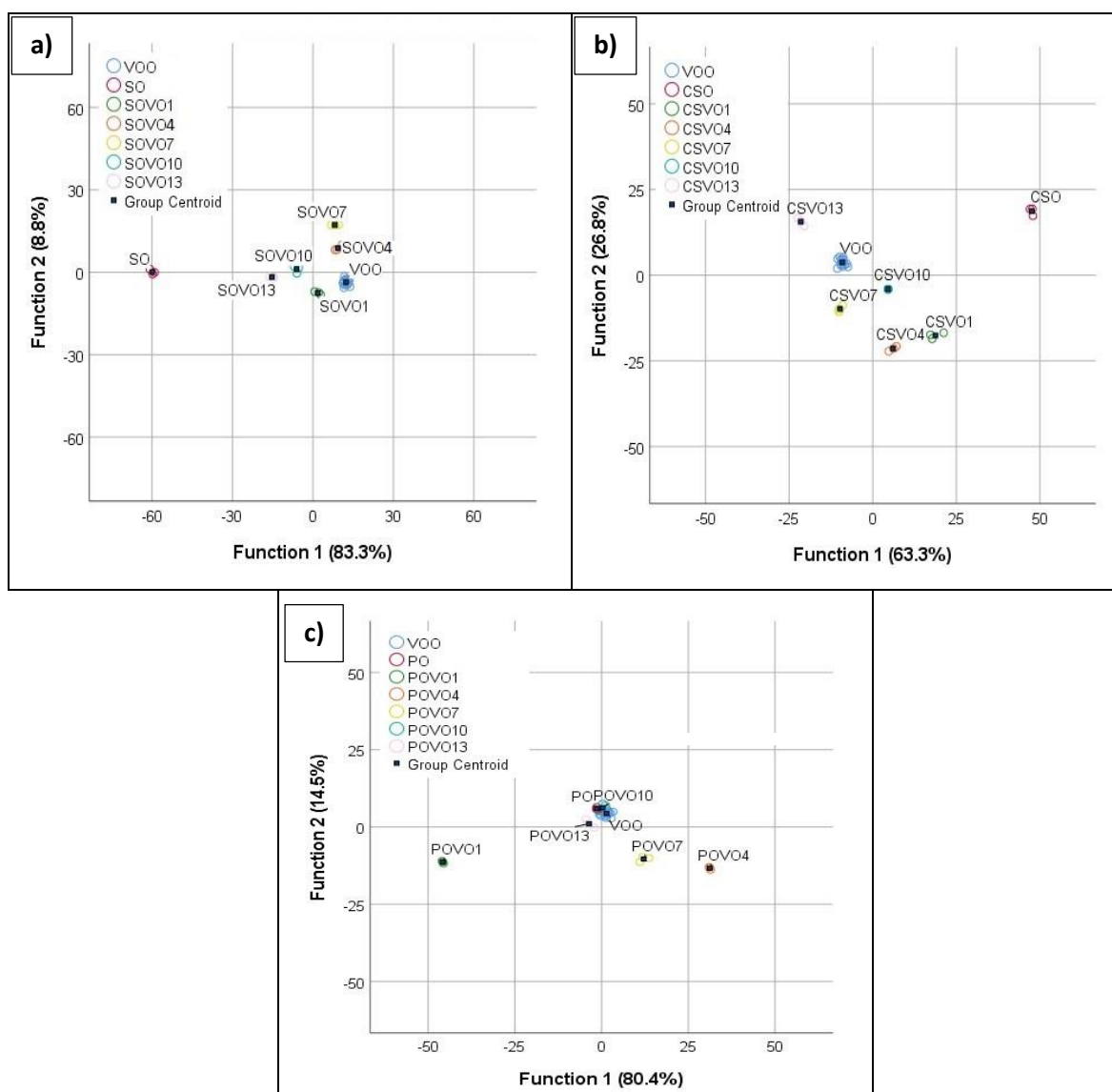


Figure 2. LDA results of adulterated oils and pure oils; a) VOO-sunflower oil, b) VOO-cottonseed oil, c) VOO-palm olein. Values in parentheses next to the functions are the percentage of explanation of the difference between the sample groups.

The LDA graph showing the separation of adulterated samples consisting of cottonseed oil, VOO and their mixtures is given in Figure 1c. It is seen that cottonseed oil and VOO samples are clearly separated, and the adulterated samples are also clustered in different locations on the LDA (Figure 3.)

graph. Although no sequence was observed depending on the mixing ratio, it was determined that cottonseed oil and VOO mixture were separated from natural olive oil even at a rate of 1%.

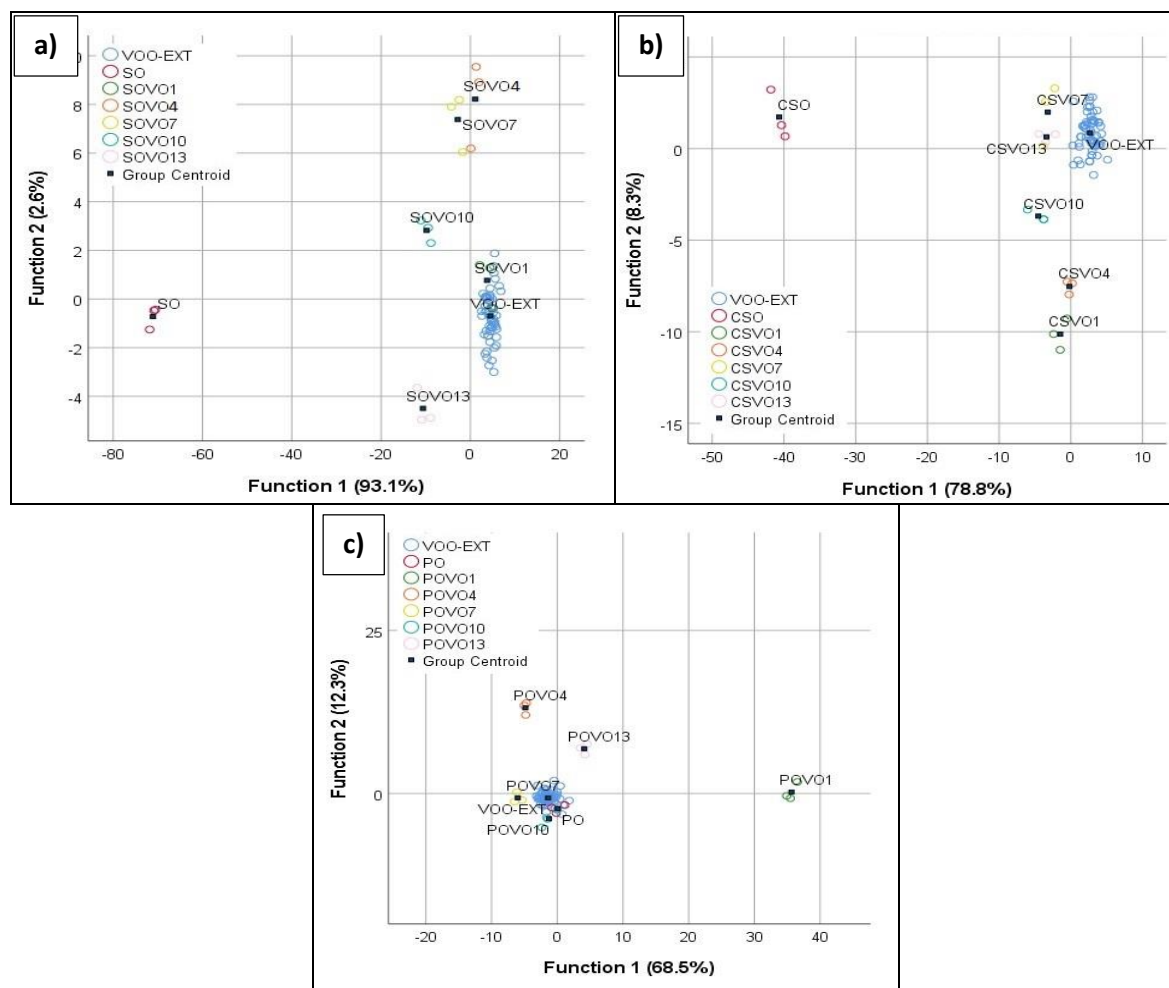


Figure 3. Extended olive oil sample set (VOO-EXT) and LDA results of adulteration samples; a) VOO-sunflower oil, b) VOO-cottonseed oil, c) VOO-palm olein. Values in parentheses next to the functions are the percentage of explanation of the difference between the sample groups.

As it is known, the chemical composition of VOOs can vary depending on many factors such as variety, climatic conditions, soil structure, agricultural practices and harvest season. This variability is likely to complicate the detection of adulterated samples and is assumed to be the major obstacle to standardizing spectroscopic techniques such as FTIR in detecting VOO adulteration. Therefore, in our study, the VOO sample set was expanded, and the LDA was repeated in order to evaluate the possible effects of the harvest season (year), variety and geographical region differences in VOOs on the detection of VOO adulteration over the FTIR spectrum - LDA. In addition to the VOO sample

used in preparing the adulterated samples, five 2020-2021 Ayvalık, five 2019-2020 Edremit and five 2019-2020 Milas samples were defined as VOO, and the LDA data set was expanded. For the repeated LDA, the expanded VOO sample set was labeled VOO-EXT (Figure 3).

The LDA graph in Figure 3a, depicts the differentiation of adulteration samples prepared with sunflower oil from the expanded VOO set. The adulterated samples containing 1% sunflower oil overlapped with VOOs, while adulterated samples with higher sunflower oil concentrations were located away from the VOOs. According to the LDA results, it was observed that the samples

containing 1% sunflower oil could be separated only from the geographically indicated Ayvalık VOO samples of the 2019-2020 season. (Figure 1a). However, the chemical diversity due to the expansion of the VOO sample set made this discrimination impossible in the latter case. Similarly, the enlargement of the VOO sample set weakened the discrimination of cottonseed oil adulterated samples and especially the samples containing 7, 10 and 13% cottonseed oil located closer to the VOO samples. Nevertheless, adulterated samples prepared with cottonseed oil were close but did not overlap with VOOs.

### CONCLUSION

Identifying frauds classified as adulteration is essential to preserve VOO's authenticity and actual economic value. The legislation establishes the standards for judging the purity of VOO, but chromatographic methods, which require substantial amounts of chemicals, time, and labor, are used to determine the chemical qualities. Numerous research has examined the possibility of detecting VOO adulteration using quick and non-destructive approaches like FTIR. However, the most significant barrier to the widespread use and standardization of spectroscopic methods has been the practicality issues related to varying validity performance at varied data sizes. The findings of our study showed that when sunflower oil, palm olein, and cottonseed oil were used as partial substitutes for VOO, the  $\Delta$ ECN42 value was a valid approach to detect adulteration. Using the  $\Delta$ ECN42 value, 1% palm oil, 1% sunflower oil and 4% cottonseed oil adulterated samples were discriminated from VOO. LDA results of FTIR data showed identical results to those of  $\Delta$ ECN42 except for palm olein adulterated samples. However, when VOO data was expanded to include VOO samples from a new variety, region, and season (Milas, Edremit samples, and 2020–2021 Ayvalık samples), the discrimination in LDA between VOO and adulterated samples prepared with cottonseed oil was diminished. Correct multivariate approach and FTIR data selection significantly influence the performance of FTIR spectroscopy for detecting VOO adulteration.

### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Ege University Office of Scientific Research Projects for funding this work under Project 22473. Also, the Geographically Indicated VOO samples used in this study were obtained via a previous scientific project (120O872) supported in the frame of the Short Term R&D Funding Program of The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TUBITAK).

### CONFLICT OF INTEREST

There are no conflicts of interest or competing with the results of the presented article.

### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Ms. Ebru Karacan conducted trials, carried out the experiments, and formatted the draft, Mr. Onur Özdikicierler conceived the idea, performed the statistical analysis, and carried out the correspondence of the MS, Mr. Fahri Yemişçioglu was responsible for the supervision and maintaining the collaboration. All authors have participated in the writing of the MS.

### REFERENCES

- Aloisi, I., Zoccali, M., Dugo, P., Tranchida, P. Q., Mondello, L. (2020). Fingerprinting of the unsaponifiable fraction of vegetable oils by using cryogenically-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-high resolution time-of-flight mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 13, 1523-1529.
- Anonymous (2017). Standard for olive oils and olive pomace. Codex Alimentarius Council. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/committees/committee-detail/es/?committee=CCFO>. (Accessed 09 February 2023).
- Anonymous (2017b). Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatography. International Olive Council. *International Olive Council Standard Method*.
- Anonymous (2017c). Determination of the difference between actual and theoretical content of triacylglycerols with ECN42. International Olive Council. *International Olive Council Standard Method*.

- Anonymous (2022). Commission Delegated Regulation (EU) 2022/2104 of 29 July 2022 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards marketing standards for olive oil, and repealing Commission Regulation (EEC) No 2568/91 and 2022/2104. European Commission. Official Journal of the European Union.
- Anonymous (1999). Standard for Named Vegetable Oils. *Codex Alimentarius*. Codex Alimentarius Council. Codex Stan 210-1999.
- Anushree, S., André, M., Guillaume, D., Frédéric, F. (2017). Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. A review. *Agronomy for sustainable development*, 37: 1-10. DOI: 10.1007/s13593-017-0426-x.
- Aroca-Santos, R., Cancilla, J. C., Pérez-Pérez, A., Moral, A., Torrecilla, J. S. (2016). Quantifying binary and ternary mixtures of monovarietal extra virgin olive oils with UV-vis absorption and chemometrics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 234: 115-121. DOI: 10.1016/j.snb.2016.04.094.
- Baeten, V., Fernández Pierna, J. A., Dardenne, P., Meurens, M., García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R. (2005). Detection of the presence of hazelnut oil in olive oil by FT-Raman and FT-MIR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(16), 6201-6206. DOI: 10.1021/jf050595n.
- Balkan, B., Meral, S. (2017). Olive Oil Industry Dynamics: The Case of Turkey. *35th International Conference of the System Dynamics Society and 60th Anniversary of System Dynamics Celebration*: 1-26. [https://www.researchgate.net/profile/Busra\\_Atamer/publication/320386514\\_Olive\\_Oil\\_Industry\\_Dynamics\\_The\\_Case\\_of\\_Turkey/links/59e0fd4aca2724cbfdb6b69/Olive-Oil-Industry-Dynamics-The-Case-of-Turkey.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Busra_Atamer/publication/320386514_Olive_Oil_Industry_Dynamics_The_Case_of_Turkey/links/59e0fd4aca2724cbfdb6b69/Olive-Oil-Industry-Dynamics-The-Case-of-Turkey.pdf). (Accessed 9 February 2023).
- Ben Hmida, R., Gargouri, B., Chtourou, F., Sevim, D., Bouaziz, M. (2022). Fatty acid and triacylglycerid as markers of virgin olive oil from mediterranean region: Traceability and chemometric authentication. *European Food Research and Technology*, 248(7), 1749-1764.
- Bozdogan Konuskan, D., Mungan, B. (2016). Effects of Variety, Maturation and Growing Region on Chemical Properties, Fatty Acid and Sterol Compositions of Virgin Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 93(11). Springer Berlin Heidelberg: 1499-1508. DOI: 10.1007/s11746-016-2904-8.
- Chiavaro, E. (2014). *Differential Scanning Calorimetry: Applications in Fat and Oil Technology*. DOI: 10.1201/b17739.
- Çalışlar, S., Zorlusoy, E., Doğan, N. (2018). Palm Yağı ve Kanatlı Hayvan Beslemede Kullanımı. *Selçuk Journal of Agricultural and Food Sciences* 32(3): 575-586. DOI: 10.15316/sjafs.2018.139.
- Dourtoglou, V. G., Dourtoglou, T., Antonopoulos, A., Stefanou, E., Lalas, S., Poulos, C. (2003). Detection of olive oil adulteration using principal component analysis applied on total and regio FA content. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(3): 203-208. DOI: 10.1007/s11746-003-0677-1.
- Esteki, M., Simal-Gandara, J., Shahsavari, Z., Zandbaaf, S., Dashtaki, E., Vander Heyden, Y. (2018). A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food control*, 93: 165-182. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.06.015.
- Filoda, P. F., Fetter, L. F., Fornasier, F., Schneider, R. D. C. D. S., Helfer, G. A., Tischer, B., da Costa, A. B. (2019). Fast methodology for identification of olive oil adulterated with a mix of different vegetable oils. *Food Analytical Methods*, 12(1): 293-304. *Food Analytical Methods*. Food Analytical Methods.
- Green, H. S., Li, X., De Pra, M., Lovejoy, K. S., Steiner, F., Acworth, I. N., Wang, S. C. (2020). A rapid method for the detection of extra virgin olive oil adulteration using UHPLC-CAD profiling of triacylglycerols and PCA. *Food Control*, 107, 106773.
- Gómez-Caravaca, A. M., Maggio, R. M., Cerretani, L. (2016). Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. *Analytica Chimica Acta*, 913: 1-21. DOI: 10.1016/j.aca.2016.01.025.

- Jabeur, H., Zribi, A., Makni, J., Rebai, A., Abdelhedi, R., Bouaziz, M. (2014). Detection of Chemlali extra-virgin olive oil adulteration mixed with soybean oil, corn oil, and sunflower oil by using GC and HPLC. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(21): 4893-4904.
- Lia, F., Morote Castellano, A., Zammit-Mangion, M., Farrugia, C. (2018) Application of fluorescence spectroscopy and chemometric models for the detection of vegetable oil adulterants in Maltese virgin olive oils. *Journal of Food Science and Technology* 55(6): Springer India: 2143–2151. DOI: 10.1007/s13197-018-3131-0.
- Mariotti, M., Peri, C. (2014) The composition and nutritional properties of extra-virgin olive oil. In: Peri C (ed.) *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*, pp. 21–34.
- Massart, D. L., Vandeginste, B. G., Buydens, L. M., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke, J., Jong, S. D. (1998). *Handbook of chemometrics and qualimetrics*. Elsevier Science Inc..
- Milanez, K. D. T. M., Nóbrega, T. C. A., Nascimento, D. S., Insausti, M., Band, B. S. F., Pontes, M. J. C. (2017). Multivariate modeling for detecting adulteration of extra virgin olive oil with soybean oil using fluorescence and UV–Vis spectroscopies: A preliminary approach. *LWT-Food Science and Technology*, 85: 9-15. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.06.060.
- Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U. (2008) Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews* 43(2): 134–179. DOI: 10.1080/05704920701829043.
- Nigri, S., Oumeddour, R. (2013) Fourier transform infrared and fluorescence spectroscopy for analysis of vegetable oils. *MATEC Web of Conferences* 5: 04028. DOI: 10.1051/mateconf/20130504028.
- Ordoudi, S. A., Özdikicierler, O., Tsimidou, M. Z. (2022). Detection of ternary mixtures of virgin olive oil with canola, hazelnut or safflower oils via non-targeted ATR-FTIR fingerprinting and chemometrics. *Food Control*, 142, 109240. DOI: 10.1016/j.foodcont.2022.109240.
- Öztürk, B., Ankan, A. Özdemir, D. (2010) *Olive Oil Adulteration with Sunflower and Corn Oil Using Molecular Fluorescence Spectroscopy*. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-374420-3.00050-4.
- Pan, M., Sun, S., Zhou, Q., Chen, J. (2018). a simple and portable screening method for adulterated olive oils using the hand-held FTIR spectrometer and chemometrics tools. *Journal of food science*, 83(6): 1605-1612. DOI: 10.1111/1750-3841.14190.
- Saygın Gümüşkesen, A., Yemişçiöglu, F. (2010). *Bitkisel Sını ve Katı Yağ Üretim Teknolojisi*. İzmir: Sidas Medya.
- Squeo, G., Grassi, S., Paradiso, V. M., Alamprese, C., Caponio, F. (2019). FT-IR extra virgin olive oil classification based on ethyl ester content. *Food Control*, 102, 149-156.
- Tsimidou, M. Z., Ordoudi, S. A., Nenadis, N., Mourtzinou, I. (2015). *Food Fraud*. 1st ed. Elsevier Ltd. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00010-6.
- Uncu, A. T., Uncu, A. O., Frary, A., Doganlar, S. (2017). Barcode DNA length polymorphisms vs fatty acid profiling for adulteration detection in olive oil. *Food chemistry*, 221: 1026-1033. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.059.
- Uncu, O., Ozen, B., Tokatli, F. (2019). Use of FTIR and UV–visible spectroscopy in determination of chemical characteristics of olive oils. *Talanta* 201(February). Elsevier B.V.: 65–73. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.03.116.
- Vitaglione, P., Savarese, M., Paduano, A., Scalfi, L., Fogliano, V., Sacchi, R. (2015). Healthy virgin olive oil: A matter of bitterness. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(13): 1808-1818. DOI: 10.1080/10408398.2012.708685.
- Zhang, X., Qi, X., Zou, M., Liu, F. (2011). Rapid authentication of olive oil by Raman spectroscopy using principal component analysis. *Analytical letters*, 44(12): 2209-2220. DOI: 10.1080/00032719.2010.546030.



## LOW-FAT COOKIES WITH *CHLORELLA VULGARIS*: EFFECTS ON DOUGH RHEOLOGY, PHYSICAL, TEXTURAL AND SENSORY PROPERTIES OF COOKIES

Ayşe Neslihan Dündar<sup>1</sup>, Oya Irmak Şahin<sup>2</sup>, Furkan Türker Sarıcaoğlu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Natural Science, Bursa Technical University, Bursa, Turkey

<sup>2</sup> Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Yalova University, Yalova, Turkey

Received / Geliş: 05.08.2022; Accepted / Kabul: 03.04.2023; Published online / Online baskı: 20.04.2023

Dündar, A. N., Şahin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2023). Low-fat cookies with *Chlorella vulgaris*: effects on dough rheology, physical, textural and sensory properties of cookies. GIDA (2023) 48 (3) 526-544 doi: 10.15237/gida.GD22076

Dündar, A. N., Şahin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2023). *Chlorella vulgaris* içeren az yağlı kurabiyeler: Hamur reolojisi, fiziksel, dokusal ve duyuşal özellikler üzerine etkileri. GIDA (2023) 48 (3) 526-544 doi: 10.15237/gida.GD22076

### ABSTRACT

Microalgae are an enormous biomass used for fortification in foods that represent a promising source of protein. Enrichment of baked foods with microalgae is a challenge for its textural and structural impacts. In this study, dough rheology, physical, textural and sensorial properties of low-fat cookies with *Chlorella vulgaris* at various concentration (0.5, 1.5 and 3.0 %) were evaluated. Dry matter (93.20 to 94.89, %), protein (5.55 to 7.08, %), ash (0.47 to 0.55, %) and fat (12.35 to 13.37, %) contents of cookies were significantly increased with increasing microalgae concentration, whereas carbohydrate amount did not change significantly. The creep parameters, recovery behavior and viscoelasticity were increased with the addition of *Chlorella* biomass where results clearly showed more stiff dough structure. As the microalgae concentration increased, a significant color change (33.25,  $\Delta E$ ) with high hardness (198.69 up to 330.86, N) and fracturability (88.66 up to 165.18, N) properties were observed.

**Keywords:** Low-fat cookie, *Chlorella vulgaris*, microalgae, rheology, textural properties

## CHLORELLA VULGARIS İÇEREN AZ YAĞLI KURABİYELER: HAMUR REOLOJİSİ, FİZİKSEL, DOKUSAL VE DUYUSAL ÖZELLİKLER ÜZERİNE ETKİLERİ

### ÖZ

Mikroalgler, umut verici bir protein kaynağını temsil eden gıdalarda zenginleştirme için kullanılan muazzam bir biyokütledir. Fırınlanmış gıdaların mikroalglerle zenginleştirilmesi, dokusal ve yapısal etkileri nedeniyle zorlu bir iştir. Bu çalışmada, çeşitli konsantrasyonlarda (%0.5, 1.5 ve 3.0) *Chlorella vulgaris* içeren az yağlı kurabiyelerin hamur reolojisi, fiziksel, dokusal ve duyuşal özellikleri değerlendirilmiştir. Kurabiyelerin kuru madde (%93,20 ila 94,89), protein (%5,55 ila 7,08), kül (%0,47

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: furkan.saricaoglu@btu.edu.tr

☎: (+90) 224 300 3667

Ayşe Neslihan Dündar; ORCID no: 0000-0003-2084-7076

Oya Irmak Şahin; ORCID no: 0000-0003-2225-7993

Furkan Türker Sarıcaoğlu; ORCID no: 0000-0003-1173-5793

ila 0,55) ve yağ (%12,35 ila 13,37) içerikleri artan mikroalg konsantrasyonu ile önemli ölçüde artarken, karbonhidrat miktarı önemli ölçüde değişmemiştir. Sürünme parametreleri, toparlanma davranışı ve viskoelastisite, sonuçların daha sert hamur yapısını açıkça gösterdiği Chlorella biyokütlesinin eklenmesiyle artmıştır. Mikroalg konsantrasyonu arttıkça, yüksek sertlik (198.69 ila 330.86, N) ve kırılabilirlik (88.66 ila 165.18, N) özellikleri ile önemli bir renk değişimi (33.25, ΔE) gözlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Az yağlı kurabiye, *Chlorella vulgaris*, mikroalg, reoloji, tekstürel özellikler

### INTRODUCTION

“Functional foods” include foods and/or food ingredients that exert a positive effect on human health with reduction in the risk of chronic diseases, besides its nutritional functionality. Functional food development is progressing widely all around the world and, for the last two decades, microalgae have received an increasing interest and attention due to be a promising source for protein, fatty acids and other biologically active functional ingredients with significant therapeutic applications such as protective effect against diabetes and obesity. These advantages make microalgae a good raw material and ingredient for food production. *Chlorella* sp., with *Spirulina* sp., is the mostly cultivated microalgae for food applications all around the world. According to the WHO, using *Spirulina* and *Chlorella* biomasses together can provide high quality proteins for human consumption according to their basic amino acid profiles. *Chlorella* sp. provide nutrients including protein (11-58 %), carbohydrate (12-28 %) and lipid (2-46 %). They also contain important vitamins for the human body such as provitamin A, β-carotene, vitamin E, thiamine (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), vitamin (B6), B12, biotin and folic acid. These nutritional benefits make the microalgae a valuable and innovative ingredient and can cause significant and interesting physicochemical changes and nutritional improving in food products (Uribe-Wandurraga, vd., 2020).

With the increase in the awareness of healthy foods, it has been understood that most of the main nutritional problems today are serious health problems associated with high consumption of fat and energy. The reduction of dietary fat has become a public health issue and a concern for most consumers. While fat consumption in the USA and Europe accounts for approximately 40% of the total daily calories,

health experts recommend it not to exceed 30% (Zoulias, vd., 2002). This recommendation is made due to the association of high fat intake with obesity, cancer, high blood cholesterol, and coronary heart disease disorders. The WHO stated that the fat content of the processed food should be reduced by the food producers in order to reduce the rate of obesity in the world (Laguna, vd., 2012).

Cookies, containing high amount of sugar and fat and low water, are widely consumed among the baked food products all around the world. Cookie doughs mainly consist of high amount of shortening (20-30% on flour weight basis), which is not desirable for a healthier nutrition. Therefore, replacement and/or reduced fat cookies are more acceptable for consumers caring about their health. However, higher hardness and lower brittleness can be obtained from fat replaced or reduced cookies when compared to full fat counterparts (Laguna, vd., 2012). There are many studies focusing on the production of reduced-fat (low-fat) cookies by reducing the shortening amount. In the study of Zoulias, vd. (2000), the effect of sucrose replacement with polyols or fructose on dough rheology and properties of reduced-fat cookies were investigated. In another study, in order to investigate the effect of fruit powder addition (apple or apricot powder) on the quality of low-fat cookies, 10, 20, and 30% of fruit powders were used instead of wheat flour. The replacement of flour by apple and apricot powders in wire-cut cookie formulation resulted that the physical characteristics, total dietary fiber contents and textural properties of the cookies were significantly improved (Özboy-Özbaş, vd., 2010). Sokmen, vd. (2022) examined the bee pollen (BP) in the production of reduced-fat cookies (shortening amount was reduced by 30%), and wheat flour was replaced by 5, 10, 15% BP, and results revealed that the addition of BP increased



the nutritional value, total phenol content and antioxidant capacity of reduced-fat cookies. As can be seen from the literature, the reducing of shortening amount of cookies is called “reduced or low fat” cookie production. In these studies, fat replacers were not used, and the additives such as bee pollen, fruit powders, polyols etc. were replaced with wheat flour, and the resulting cookies defined as “low-fat”. It is well known that it is hard to produce low-fat cookies without affecting the structural, visual, color and sensorial properties of cookies. In addition, healthy ingredients such as proteins, fibers, antioxidants, vitamins, and minerals are included in the cookie production for healthier end-product (Fradinho, vd., 2015; Šaponjac, vd., 2016).

In previous studies, the microalgae biomass such as *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana*, *Dunaliella salina* and *Spirulina platensis* were used for coloring agent and functional food production purposes in cookies (Batista, vd., 2017; Gouveia, vd., 2007; Gouveia, vd., 2008; Sahni, vd., 2019; Şahin, 2020). To the best of our knowledge, rheological properties of reduced-fat cookie doughs with *Chlorella vulgaris* have not been studied so far, and in this study, the use of *Chlorella vulgaris* at various concentrations for the production of reduced-fat cookies was carried out. The detailed rheological characterization of cookie doughs, as well as color, physical, textural and sensory attributes of the cookies, were examined.

## MATERIALS and METHODS

### Materials

*Chlorella vulgaris* (UTEX 26) strains were purchased from the Culture Collection of Algae, Texas University (Austin, Texas, USA). Wheat flour consisting of 13.0% moisture, 9.80% protein, 0.65% ash and 24.0% wet gluten was kindly provided from Toru Un Inc. (Turkey). Other ingredients used in the formulation of cookies (powdered sugar, brown sugar, sodium bicarbonate, salt, skimmed milk powder, shortening) were purchased from the local market. All the chemicals used both for the analysis and microalgae medium were of analytical grade.

### Production of *Chlorella vulgaris* biomass

*Chlorella vulgaris* (UTEX 26) in Proteose Medium was pre-cultured for 7 days and then cultivated in batch mode for 15 days in photobioreactor (PBR) at 25 °C with 12/12 lightening period at 3200 lux. The used medium was prepared with 2.94 mM of NaNO<sub>3</sub>, 0.43 mM of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.29 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3 mM of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.17 mM of CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.43 mM of NaCl, and 1 g/L of proteose peptone. The biomass was harvested when the growth of microalgae achieved a stationary phase, centrifuged at 6000xg and then freeze dried (Teknosem, TRS2/2V, Turkey). The freeze-dried algal biomass was grounded with a coffee grinder and sieved from 212 µm. The freeze-dried biomass consisted of 5.83±0.08% moisture, 9.85±0.02% ash, 53.75±0.09% protein, 14.09±0.45% lipid and 16.48±0.07% carbohydrate (Aguirre ve Bassi, 2013).

### Preparation of cookies

The cookies were prepared by AACC Method No: 10–54 (AACC, 1990). The baked cookies were left to cool before they were wrapped in aluminum foil and allowed to stand at room temperature until the analysis. For the production of low fat cookies, the amount of shortening in the cookie formulation was reduced by 30%. Cookies were prepared using the ingredients as indicated in Table 1. The dry ingredients except for flour were mixed thoroughly and the prepared dry mixture and shortening were transferred to the bowl of the mixer (Kitchen Aid, 5KSM150PSEAC model, USA) and mixed for a total of 3 minutes by stripping every 1 minute, and thus the cream was obtained. The cream was mixed for a total of 1 minute by stripping every 15 seconds. Flour or flour-biomass mixture was added to this mixture and stripped every 10 seconds, and the cookie dough was obtained by mixing for a total of 30 seconds. The dough was taken from the bowl of the mixer and rolled to 10 mm thickness by a roller. The rolled cookie dough was cut into 40 mm diameter and 10 mm height circle disks, and then cooked in the oven at 205 ± 2 °C for 11 minutes. After cooling, cookies were stored in polyethylene bags in dark conditions at room temperature.

Table 1. The ingredients used for production of cookies (g/100 g of cookie dough).

| Ingredients               | Cnt   | 0.5%  | 1.5%  | 3.0%  |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Flour                     | 50.42 | 49.91 | 48.90 | 47.39 |
| Sucrose (fine granulated) | 16.15 | 16.15 | 16.15 | 16.15 |
| Brown sugar               | 5.79  | 5.79  | 5.79  | 5.79  |
| Skimmed milk powder       | 0.50  | 0.50  | 0.50  | 0.50  |
| Salt                      | 0.63  | 0.63  | 0.63  | 0.63  |
| Sodium bicarbonate        | 0.50  | 0.50  | 0.50  | 0.50  |
| Shortening                | 13.41 | 13.41 | 13.41 | 13.41 |
| Water                     | 12.60 | 12.60 | 12.60 | 12.60 |
| Chlorella spp.            | 0.00  | 0.50  | 1.51  | 3.02  |

### Rheological characterization of cookie dough

The effect of *Chlorella vulgaris* incorporation on dynamic shear, creep-recovery and three intervals thixotropic tests (3ITT) of cookie dough were characterized at 25 °C, using a rheometer (Anton Paar, MCR302 model, Austria) equipped with parallel plate geometry (diameter 25 mm, gap 3 mm) and heating Peltier system. The dough was rolled with a pin until it reached a thickness of 3 mm and cut with a circular shape at 25 mm diameter. Dough samples were placed between plates and rested for 5 min to allow relaxation and stabilize temperature. Prior to dynamic shear analysis, stress sweep tests between 1 and 100 Pa were performed at a constant frequency (1 Hz) and temperature (25 °C) to determine the linear viscoelastic region, which was selected as 10 Pa (data not shown). Storage ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) were recorded between 1 and 100 rad/s angular frequency. During measurements, the moisture loss from the samples was prevented with a lid fitted on to measuring apparatus. The obtained results of  $G'$  and  $G''$  values were subjected to non-linear regression analyses by power model, by which the viscoelasticity of food materials are widely described:

$$G' = K'(\omega)^{n'} \quad (1)$$

$$G'' = K''(\omega)^{n''} \quad (2)$$

where  $K'$  and  $K''$  (Pa.s),  $n'$  and  $n''$  and  $\omega$  are constants, frequency exponents, angular frequency (rad s<sup>-1</sup>), respectively (Rao ve Cooley, 1992).

The 3ITT of the cookie doughs was performed with the methodology of Saricaoglu, vd. (2019) for determination of deformation kinetics of cookie doughs. For this purpose, cookie doughs were tested at three intervals. The first interval was applied to cookie doughs as 10 Pa stress and 1 Hz frequency in which to LVR. High rotational shear deformation at 1000 s<sup>-1</sup> was carried out for 30 sec in the second interval, and lastly, in the third interval, regeneration interval, the same parameters as to be in the first interval were applied. During the second interval, the sample did not slip away between the plate and probe. The following equations were used for the calculation of deformation (% $D_r$ ) and recovery (% $R$ ) degree at 30 sec after the last interval:

$$\%D_r = \frac{G'_i - G'_0}{G'_i} \times 100 \quad (3)$$

$$\%R = \frac{G'_{30}}{G'_i} \times 100 \quad (4)$$

where  $G'_i$ ,  $G'_0$  and  $G'_{30}$  are storage modulus values of initial, immediately after second interval and within the first 30 sec of third interval, respectively. Non-linear regression model (Eq. 5) was applied to data obtained from the third interval using Sigma Plot software (version 10, Systat Software Inc., CA, USA). An exponential function was well fitted to data and equilibrium storage modulus ( $G'_e$ ) and maximum recovery time were estimated successfully.

$$G' = y_0 + \alpha \times (1 - e^{(-\beta \times X)}) \quad (5)$$

where  $y_0$  and  $\alpha$  are constants and  $\beta$  is recovery rate constant.

Creep-recovery test was performed at 25 °C and a constant shear stress of 100 Pa for 5 min, which was applied beyond the LVR (Pulatsu, vd., 2021). The applied stress was suddenly removed and the dough samples were monitored for 5 min for the recovery phase. All the rheological measurements were carried out in triplicate. The rheological data analysis was performed by the device software (Anton Paar, RheoCompass, v1.25, Austria) and Sigma Plot (Systat Software Inc., v10.0, CA, USA) was used for non-linear regression fitting of the data.

### Characterization of cookies

#### *Proximate Analysis*

The protein, lipid, ash and moisture content of cookies were determined according to the AACCI (1990) and AOAC (1990) methods. Carbohydrate values were calculated using Atwater general factor system according to FAO (2003). All proximate analyses were repeated, at least in triplicate, and were performed after cookie preparation.

#### *Spread ratio and color of cookies*

Diameter and thickness of the cookies were determined immediately after baking the cookies using a digital caliper (Insize 102 model, China) and the spread ratio of the cookies was determined by calculating the ratio of diameter to thickness for each cookie according to AACC 10-50.5. (2000).

Color measurements based on triple scale of  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  values were determined with a colorimeter (Konica Minolta CR-400/CR41, Japan).  $L^*$  is the lightness,  $a^*$  and  $b^*$  range from green ( $-a^*$ ) to red ( $+a^*$ ) and blue ( $-b^*$ ) to yellow ( $+b^*$ ), respectively. Total color differences of baked cookies were evaluated by using control sample as reference with following equation:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (6)$$

The triplicated measurements were taken from both inner and outer layer of cookies and the instrument was calibrated by using a standard white and black plate.

#### *Texture profile analysis*

Texture profile analysis of cookies were made by using a texture analyzer (Stable Micro Systems, TA HD Plus model, Godalming, UK) with a 100 kg load cell. All the tests were performed with a cylindrical probe at 36 mm diameter (P/36R). The pre-test and post-test speeds were 5 mm s<sup>-1</sup> and the test speed was 1.0 mm s<sup>-1</sup>. Compression distance was arranged as 7 mm and the maximum peak force determined from the first cycle was related to hardness (Hajas, vd., 2022; Soares, vd., 2023). Measurements were carried out at least with eight replicates from duplicated cookies at room temperature (25 °C).

#### *Sensory evaluation*

Baked cookie samples were evaluated in terms of sensorial properties by the panelists (n = 40, 15 men and 25 women aged 19–50 years) recruited among staff and students of Bursa Technical University. Cookies were placed in a plate and coded with three random digits, and offered to panelists in random order with the product evaluation sheet. The taste-free water was used for palate cleansing. Cookies were evaluated in terms of surface and cross-section appearance, taste, texture, overall acceptance and affordability using 9-point hedonic scale (1= dislike extremely; 2=dislike very much; 3=dislike moderately; 4=dislike slightly; 5=neither like nor dislike; 6=like slightly; 7=like moderately; 8=like very much; 9= like extremely) (Everitt, 2009).

#### *Data analysis*

The results of analyses were illustrated as mean ± standard deviation. All analyses were performed at least in triplicate per duplicated cookie samples. The statistical differences between cookie samples were evaluated by one-way Analysis of Variance (ANOVA) and mean differences were determined using Duncan's multiple comparison at a significance level of 5% with SPSS program (IBM Corp., version 21.0, USA). The non-linear regression analyses of rheological data were performed with Sigma Plot program (Systat Software Inc., v10.0, CA, USA).

**RESULTS and DISCUSSIONS**

**Rheological properties of cookie dough**

The rheological properties of cookie dough have high impact on the process ability and quality of cookies. The results of dynamic shear properties, elastic ( $G', Pa$ ) and viscous ( $G'', Pa$ ) modulus, give significant information about mechanical strength and extrusion capacity of cookie dough (Huang, vd., 2020). The dynamic shear spectra of *Chlorella vulgaris* incorporated cookie doughs is illustrated in Fig. 1.  $G'$  was greater than  $G''$  in the entire measured frequency range indicating the prevalence of elastic properties over viscous properties. The dynamic spectra of cookie samples showed no cross-over point throughout the measured frequency range revealing the nature of solid-like behavior (Yang, vd., 2019). Control sample showed the lowest  $G'$  and  $G''$  values for entire frequency range when compared

$G'$  and  $G''$  values of cookie doughs showed an increasing tendency with rising oscillation frequency, and thus, it was possible to model these modulus as a power function of oscillatory frequency (Eq. (1) and (2)), and results are illustrated in Table 2. It is clear that the  $R^2$  values of equations were higher than 0.97 which indicates that this power function can successfully describe the dynamic mechanical spectra of cookie doughs. The incorporation of microalgae at 0.5% did not significantly affect the  $K'$  values, whereas it was significantly increased when

with the values of microalgae enriched cookie doughs, which indicated that viscoelastic behavior was modified by additives, but elastic solid-like behavior was improved predominantly. This means that microalgae incorporated cookie doughs can more easily recover energy from deformation. The increase of microalgae concentration caused the increase of both  $G'$  and  $G''$  values, considering that microalgae are a source of hydrocolloids, mainly proteins, which are generally recognized for their ability to enhance water absorption in doughs (Rosell, vd., 2001). It was also reported by Graça, vd. (2018) that the addition of 3.0 g *Chlorella vulgaris* based on wheat flour increased  $G'$  values, showing a possible strengthening of the dough structure due to viscoelastic protein matrix reinforcement depending on high protein content of microalgae.

*Chlorella vulgaris* concentration increased to 1.5% and 3.0%. However, 0.5% microalgae addition increased the  $K''$  values significantly, when compared to control. These results showed that elastic and viscous properties of cookie doughs were enhanced with the incorporation of *Chlorella vulgaris*. The slopes ( $n'$  and  $n''$ ) of both moduli did not significantly affect from the addition of microalgae, and  $n''$  values were higher than  $n'$  for all samples, which means loss modulus is more dependent on frequency change.

Table 2. Dynamic shear parameters of power-law functions describing the  $G'$  and  $G''$  values of microalgae incorporated cookies.

| Samples | $G' = K'(\omega)^{n'}$ |           |       | $G'' = K''(\omega)^{n''}$ |           |       |
|---------|------------------------|-----------|-------|---------------------------|-----------|-------|
|         | $K'$                   | $n'$      | $R^2$ | $K''$                     | $n''$     | $R^2$ |
| Cnt     | 7.72±0.10 <sup>c</sup> | 0.26±0.01 | 0.998 | 2.99±0.04 <sup>c</sup>    | 0.29±0.04 | 0.980 |
| 0.5%    | 7.94±0.12 <sup>c</sup> | 0.27±0.01 | 0.997 | 3.21±0.05 <sup>b</sup>    | 0.28±0.04 | 0.984 |
| 1.5%    | 8.44±0.14 <sup>b</sup> | 0.27±0.02 | 0.995 | 3.10±0.06 <sup>bc</sup>   | 0.30±0.08 | 0.979 |
| 3.0%    | 9.53±0.13 <sup>a</sup> | 0.27±0.03 | 0.997 | 4.02±0.08 <sup>a</sup>    | 0.28±0.06 | 0.979 |

Values are means ± Standard Deviation. a-c Refers the significant differences between the values in the same column ( $p < 0.05$ ). Cnt: Control;  $K'$  and  $K''$ : constants;  $n'$  and  $n''$ : frequency exponents;  $\omega$ : angular frequency (rad/s)  $R^2$ : determination coefficient of Eq. (1) and Eq. (2).

The complex viscosity ( $\eta^*$ , Pa.s), which can be obtained from dynamic shear measurements, is called as resistance against the flow of viscous liquid materials (Dimitreli ve Thomareis, 2008).

The viscosity of cookie doughs should be low enough at high shear rates for processing and shaping, but the doughs should recover its high viscosity value after processing and shaping

(Uribe-Wandurraga, vd., 2020). It is clear in Fig. 2 that the complex viscosity of all cookie doughs decreased with increasing angular frequency, showing shear-thinning behavior, and microalgae incorporation increased the complex viscosity

values of dough samples over the analyzed angular frequency ranges. The shear-thinning behavior of cookie doughs could be desired for better shaping and faster recovery after shaping (Huang, vd., 2019).

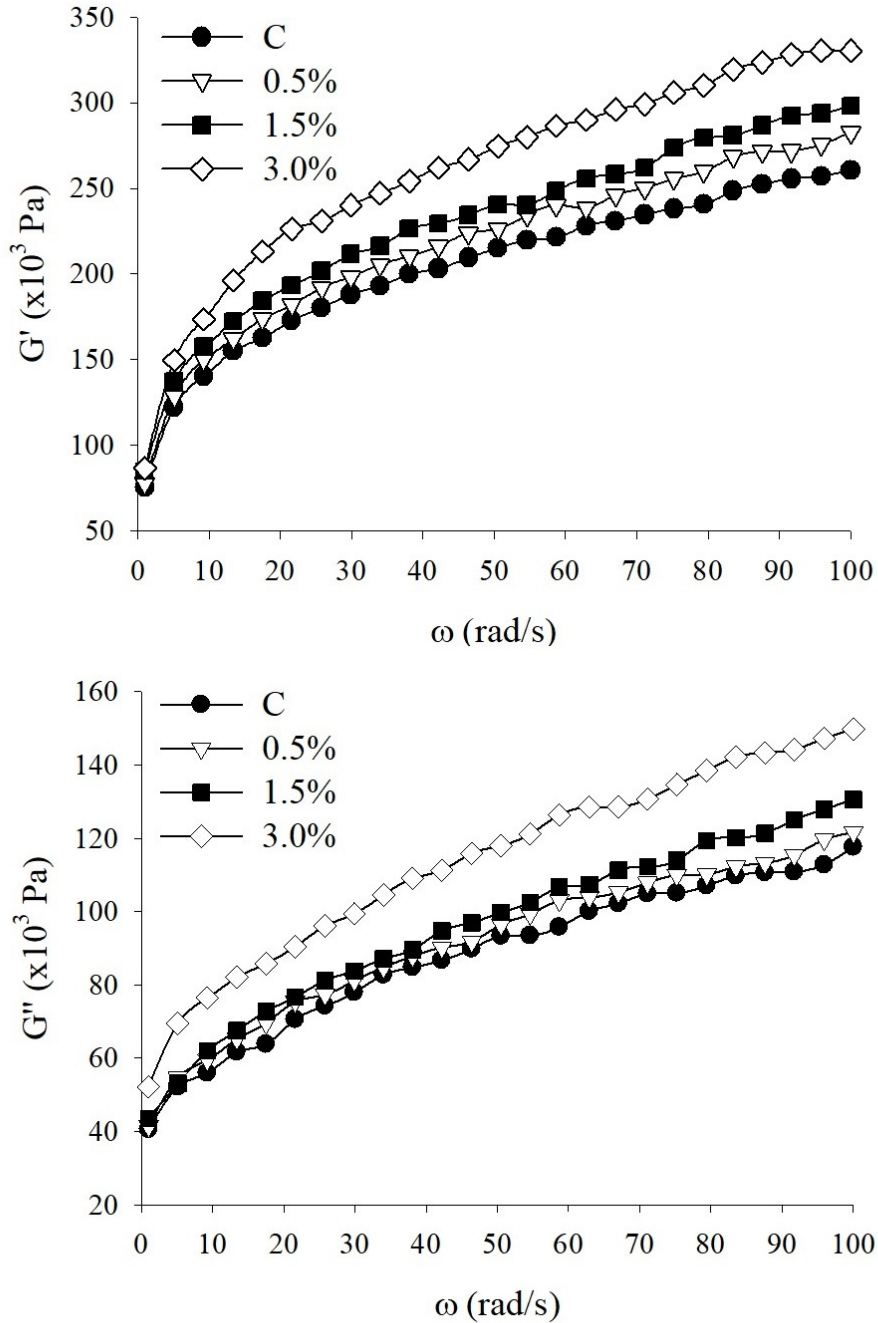


Fig. 1 Dynamic mechanical spectra of low-fat cookie doughs enriched with *Chlorella vulgaris*

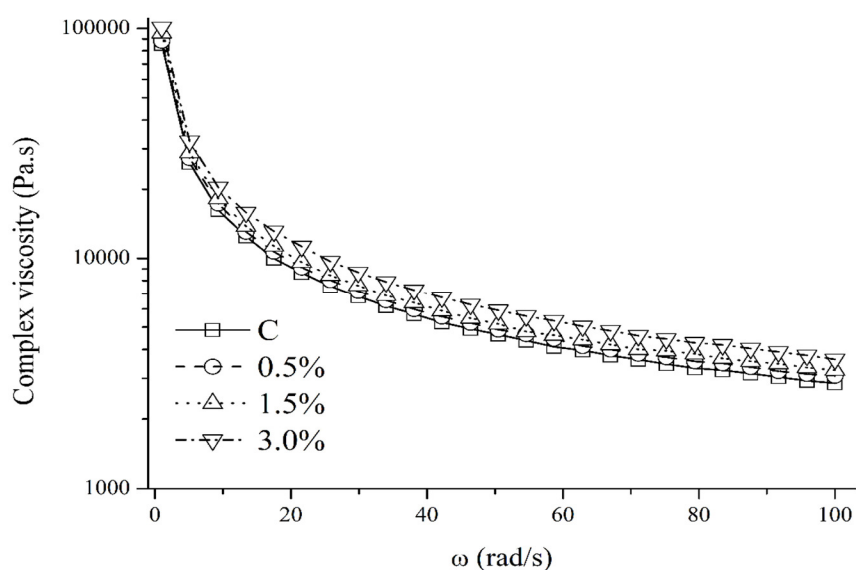


Fig. 2 The effect of microalgae concentration on complex viscosity of cookie dough

Three interval thixotropic test (3ITT) mainly consists of 3 different analyses stages containing reference, high shear deformation and regeneration. This test simulates the behavior of food materials during transporting, handling and processing (Saricaoglu, vd., 2019). As seen in Fig. 3,  $G'$  was higher than  $G''$  indicating that cookie doughs, either control or microalgae enriched, had elastic character rather than viscous one. At the beginning of the third interval, 1.5% microalgae incorporated cookie doughs showed higher  $G''$  than  $G'$ , and then  $G'$  increased rapidly and showed higher values than  $G''$ . This result indicated that viscous character immediately after the second interval was dominant for cookie dough containing 1.5% microalgae, and this could be attributed to broken internal structure. Microalgae incorporated cookie dough at 0.5% showed the highest decrease both for  $G'$  and  $G''$  probably due to the easily destroyed weak electrostatic and hydrophobic bonds with high shear deformations (Isanga ve Zhang, 2009).

The results related to 3ITT as well as non-linear regression analyses (Fig. 4) of 3<sup>rd</sup> interval are given in Table 3. Storage modulus of samples before deformation ( $G'_i$ ) significantly increased with the addition of *Chlorella vulgaris* up to 1.5%, and then increased insignificantly. The addition of protein rich component in cookie dough caused a

significant increase due to binding water as observed before in dynamic shear properties. After high shear deformation, the lowest initial storage modulus ( $G'_0$ ) was observed from 0.5% *Chlorella* supplemented sample, and the increase of concentration from 1.5 to 3% significantly increased the  $G'_0$  values. This means that the addition of *Chlorella* to cookie doughs improves the recovery of samples after high shear deformations such as processing, shaping and handling. The lowest  $D_r$  value (58.69%) was observed from control sample, and the addition of *Chlorella vulgaris* at 0.5 and 1.5% significantly increased the  $D_r$  values, whereas control and 1.5% microalgae added samples displayed similar values with 3% addition. The cookie doughs are prepared with mixing in a bowl and then the doughs are shaped prior to cooking. Considering the findings of present study, the addition of microalgae caused higher relative deformation, probably due to binding of water by proteins of *Chlorella vulgaris*, and hence displayed higher deformation after mixing. However, after 30 s of high shear deformation, samples showed high  $D_r$  values had high recovery percentage. This means that microalgae incorporated cookie doughs can be mixed with higher speed and/or longer time for better homogenization, because they can show high recovery after 30 s of deformations such as mixing, shaping. The results of 3<sup>rd</sup> interval

were subjected to non-linear regression with high  $R^2$  values ranging from 0.946 to 0.961. Equilibrium storage modulus ( $G'_{eq}$ ), maximum storage modulus can be reached at maximum time ( $t_{eq}$ ), increased insignificantly with increasing concentration. Time for reaching  $G'_{eq}$  was firstly decreased when compared to control, and

increased to 32.31 min at 3% microalgae concentration. The maximum recovery rates ( $Rec_{max}$ ) of samples increased insignificantly, and the highest value was observed at 3% addition. These results show that 0.5 and 1.5% *Chlorella vulgaris* incorporated cookie doughs can recover higher and faster than control and 3% microalgae added samples after high shear deformation.

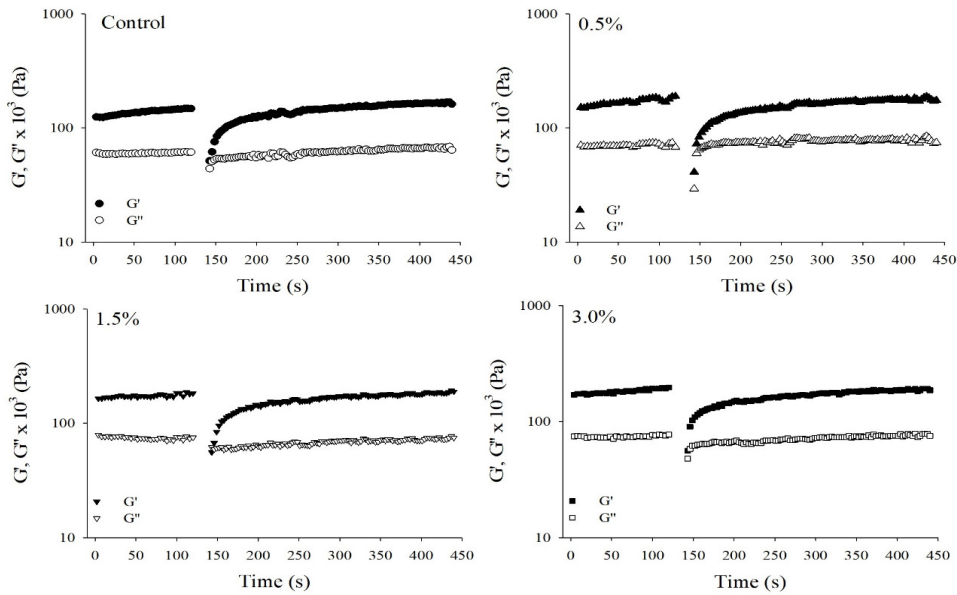


Fig. 3 Effect of *Chlorella vulgaris* addition on structural deformation and regeneration of low-fat cookie dough

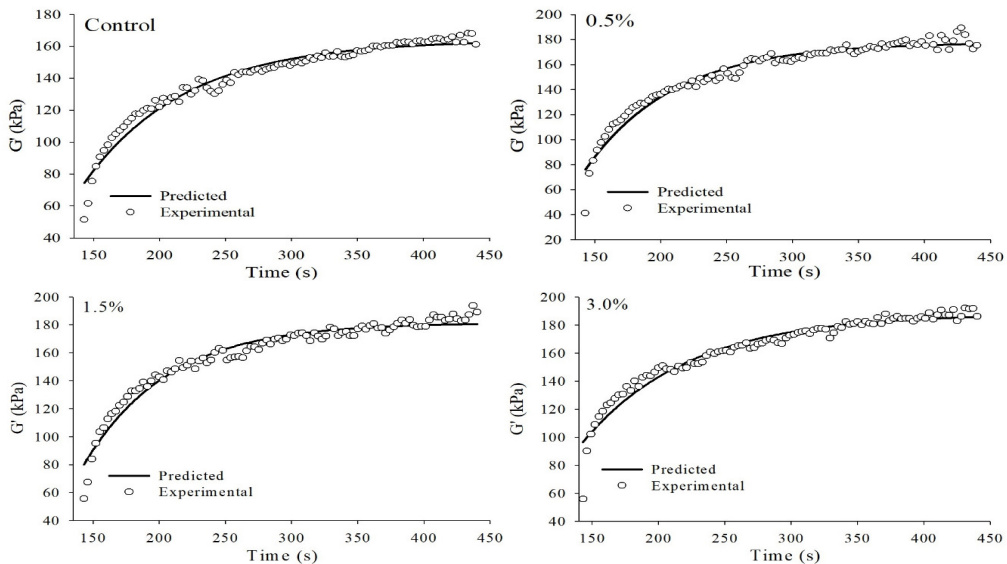


Fig. 4 Nonlinear regression modeling of recovery (third) interval of low-fat cookies with *Chlorella vulgaris*

Table 3. Effect of *Chlorella* concentration on 3ITT results and non-linear regression parameters of 3<sup>rd</sup> interval.

| Parameters        | Concentration (%)        |                          |                          |                          |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | Cnt                      | 0.5                      | 1.5                      | 3.0                      |
| $G'_i$ (kPa)      | 124.27±2.69 <sup>c</sup> | 151.66±3.27 <sup>b</sup> | 164.21±2.63 <sup>a</sup> | 169.61±3.82 <sup>a</sup> |
| $G'_0$ (kPa)      | 51.34±2.86 <sup>b</sup>  | 41.14±2.45 <sup>c</sup>  | 55.87±3.56 <sup>b</sup>  | 65.87±3.39 <sup>a</sup>  |
| $D_r$ (%)         | 58.69±1.41 <sup>c</sup>  | 72.87±2.20 <sup>a</sup>  | 65.98±1.63 <sup>b</sup>  | 61.16±2.88 <sup>bc</sup> |
| $Rec$ (%)         | 66.95±2.91               | 72.88±1.39               | 68.12±3.01               | 66.12±3.18               |
| $y_0 \times 10^5$ | -4.05±0.09 <sup>b</sup>  | -6.74±0.18 <sup>c</sup>  | -7.86±0.14 <sup>d</sup>  | -3.54±0.17 <sup>a</sup>  |
| $a \times 10^5$   | 5.69±0.04 <sup>c</sup>   | 8.52±0.13 <sup>b</sup>   | 9.68±0.16 <sup>a</sup>   | 5.42±0.07 <sup>c</sup>   |
| $b$               | 0.014±0.001              | 0.015±0.001              | 0.016±0.001              | 0.012±0.001              |
| $R^2$             | 0.961                    | 0.957                    | 0.957                    | 0.946                    |
| $G'_{eq}$ (kPa)   | 163.99±14.14             | 177.99±5.66              | 181.99±1.41              | 187.99±9.90              |
| $t_{eq}$ (min)    | 28.63±1.51               | 26.30±2.50               | 24.77±2.21               | 32.31±3.83               |
| $Rec_{max}$ (%)   | 76.13±8.20               | 85.21±0.87               | 90.23±0.74               | 90.29±2.72               |

Values are means ± Standard Deviation. Values are means ± Standard Deviation. a-d Refers the significant differences between the values in the same row ( $p < 0.05$ ). *Cnt*: Control;  $G'_i$ : Storage modulus of the sample before deformation;  $G'_0$ : Initial storage modulus after high shear deformation;  $D_r$ : Relative deformation;  $Rec$ : Recovery percentage of sample after 30 s of 3rd interval;  $G'_{eq}$ : Equilibrium storage modulus at  $t_{eq}$ ;  $t_{eq}$ : Time required to reach equilibrium storage modulus;  $Rec_{max}$ : Recovery percentage of sample at equilibrium storage modulus. a-d Means within the same row with different letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

Creep and recovery tests can give significant information about internal structure of a system consisting of proteins and carbohydrates. Information about softness of a material can be estimated with creep compliance ( $J(t)$ ) values, and the higher the  $J(t)$  value, the weaker the material structure, and vice versa (Sozer, 2009). Dynamic rheological measurements including creep-recovery tests at small-strains reveal the material characteristics of samples in the LVR where no structural deformation occurred. However, it is also necessary to determine the mechanical behaviour of the cookie dough outside the LVR since high shear forces act on the cookie dough during further processing. Hence, creep-recovery tests were performed outside the LVR. Creep-recovery results are illustrated in Fig. 5, and the increasing concentration of *Chlorella vulgaris* decreased the  $J(t)$  values which means stronger internal structure occurred. The addition of microalga biomass which is rich in proteins and polysaccharides caused the occurrence of a complex matrix. Proteins and carbohydrates are responsible from the water absorption in dough, and also dough firmness (Egea, vd., 2014; Gouveia, vd., 2007; Vieira, vd., 2020). Elastic and viscous parameters of cookie doughs were obtained by the application of four components

Burgers model which is the most widely used model for foods such as ice cream mixes (Kurt, vd., 2016), emulsions (Dolz, vd., 2008), and cookie doughs (Uribe-Wandurraga, vd., 2020). The following equation called as Burgers model can be used for describing the relationship between creep compliance and time:

$$J(t) = \frac{1}{G_0} + \frac{1}{G_1} \left[ 1 - \exp\left(\frac{-tG_1}{\eta_1}\right) \right] + \frac{t}{\eta_0} \quad (7)$$

where  $J(t)$ ,  $G_0$ ,  $\eta_0$ ,  $G_1$  and  $\eta_1$  are overall compliance at any  $t$  time, instantaneous elastic modulus of Maxwell spring, Maxwell dashpot residual viscosity, elastic modulus of Kelvin-Voigt and internal viscosity of Kelvin-Voigt dashpot, respectively (Steffe, 1996). The creep parameters are summarized in Table 4, and as seen the Burgers model could be well used for describing the creep data due to high  $R^2$  values. All the creep parameters were significantly increased with the increasing microalgae addition ( $p < 0.05$ ). The increasing  $G_0$  and  $G_1$  values, as well as  $\eta_0$ , showed that cookie doughs formed a highly elastic network upon increase of *Chlorella vulgaris* concentration. Internal viscosity ( $\eta_1$ ) of samples displayed high values and it could be related with the interaction of ingredients. In addition, the



increasing microalgae concentration resulted in the higher  $\eta_1$  values probably due to high interaction between proteins of *Chlorella vulgaris* and wheat flour. Similar results were also Table 4

determined by Peressini ve Sensidoni (2009) for inulin enriched cookie dough and by Pulatsu, vd. (2021) for pomace and insoluble dietary fiber added cookie doughs.

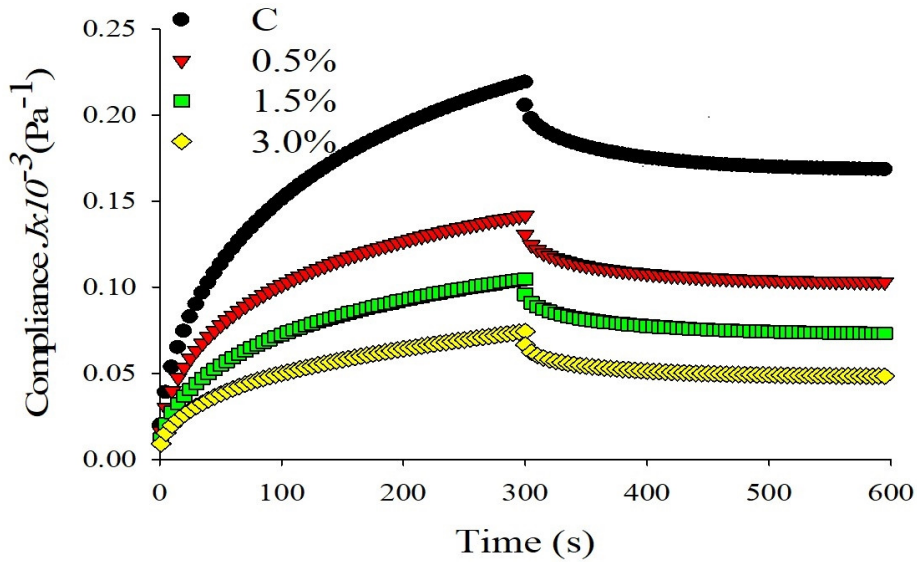


Fig. 5 Creep-recovery curves of low-fat cookie dough containing various amount of *Chlorella vulgaris*

Table 4. Burgers model parameters from creep data of cookie doughs

| Samples | Creep parameters        |                        |                         |                           |       |
|---------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
|         | $G_0$ (kPa)             | $\eta_0$ (Pa.s)        | $G_1$ (kPa)             | $\eta_1$ (Pa.s)           | $R^2$ |
| Cnt     | 33.67±0.12 <sup>d</sup> | 3.68±0.30 <sup>d</sup> | 9.01±0.19 <sup>d</sup>  | 179.61±5.65 <sup>d</sup>  | 0.999 |
| 0.5%    | 42.19±0.26 <sup>c</sup> | 6.13±0.21 <sup>c</sup> | 14.14±0.05 <sup>c</sup> | 298.78±3.95 <sup>c</sup>  | 0.999 |
| 1.5%    | 61.73±0.37 <sup>b</sup> | 7.71±0.62 <sup>b</sup> | 19.65±0.29 <sup>b</sup> | 391.36±9.89 <sup>b</sup>  | 0.999 |
| 3.0%    | 83.13±0.17 <sup>a</sup> | 9.39±0.11 <sup>a</sup> | 32.37±0.28 <sup>a</sup> | 726.34±10.08 <sup>a</sup> | 0.999 |

Values are means ± Standard Deviation. a-d Means within the same column with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ . Cnt: Control;  $G_0$ : instantaneous elastic modulus of Maxwell spring;  $\eta_0$ : residual viscosity of Maxwell dashpot;  $G_1$ : retarded elastic modulus of Kelvin-Voigt;  $\eta_1$ : internal viscosity of Kelvin-Voigt dashpot;  $R^2$ : determination coefficient of Eq. (7).

The recovery behavior of cookie doughs was also illustrated in Fig. 5, and the increasing microalgae concentration caused the decrease of recovery compliance. The recovery phase of cookie doughs was well fitted to following model:

$$J(t) = J_\infty + J_{KV} \exp(-\beta t^C) \quad (8)$$

where  $t$ ,  $\beta$ ,  $C$ ,  $J_\infty$  and  $J_{KV}$  are time, parameters for determining the speed of recovery, the recovery compliance of Maxwell dashpot and Kelvin-Voigt element, respectively. When  $t \rightarrow 0$ ,  $J(t)$  is

equal to  $J_\infty + J_{KV}$  which means the maximum deformation of the dashpots in the Burgers model. However, for  $t \rightarrow \infty$ ,  $J(t)$  is equal to  $J_\infty$ , which corresponds to the irreversible sliding of the Maxwell dashpot (Dolz, vd., 2008). Table 5 summarizes the results of recovery parameters, as well as the maximum compliance of creep phase and final recovery percentage. The maximum compliance  $J_{MAX}$  and  $J_\infty$  of samples were significantly decreased with increasing microalgae concentration. However, when compared with control  $J_{KV}$  and  $\beta$  were significantly decreased

while  $C$  increased with the microalgae addition. The lowest final recovery percentage (23.30%) was observed from control while the highest value (33.79%) was 3% added cookie dough. These results clearly showed that the addition of *Chlorella*

*vulgaris* to cookie dough caused more stiff dough structure, and take more time to recover. Similar results were also reported by Vieira, vd. (2020) for cookie doughs fortified with microalgae of *Arthrospira platensis*.

Table 5. Compliance of each element in the Burgers model, together with the final percentage recovery (R).

| Samples | $J_{MAX} \times 10^{-4} (Pa^{-1})$ | Recovery parameters                   |                                   |                          |                          | R (%) |                          |
|---------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|--------------------------|
|         |                                    | $J_{\infty} \times 10^{-4} (Pa^{-1})$ | $J_{KV} \times 10^{-4} (Pa^{-1})$ | $\beta (s^{-1})$         | $C$                      | $R^2$ |                          |
| Cnt     | 2.19±0.06 <sup>a</sup>             | 1.68±0.06 <sup>a</sup>                | 4.57±0.31 <sup>a</sup>            | 0.143±0.012 <sup>a</sup> | 0.689±0.019 <sup>b</sup> | 0.992 | 23.30±0.60 <sup>b</sup>  |
| 0.5%    | 1.42±0.07 <sup>b</sup>             | 1.03±0.08 <sup>b</sup>                | 0.53±0.06 <sup>b</sup>            | 0.026±0.003 <sup>b</sup> | 0.937±0.011 <sup>a</sup> | 0.990 | 27.52±2.37 <sup>ab</sup> |
| 1.5%    | 1.05±0.09 <sup>c</sup>             | 0.73±0.03 <sup>c</sup>                | 0.23±0.03 <sup>b</sup>            | 0.017±0.004 <sup>b</sup> | 0.989±0.009 <sup>a</sup> | 0.989 | 30.29±3.88 <sup>a</sup>  |
| 3.0%    | 0.74±0.08 <sup>d</sup>             | 0.49±0.06 <sup>d</sup>                | 0.30±0.04 <sup>b</sup>            | 0.018±0.004 <sup>b</sup> | 0.998±0.045 <sup>a</sup> | 0.986 | 33.79±0.05 <sup>a</sup>  |

Values are means ± Standard Deviation. a-d Means within the same column with different letters are different ( $p < 0.05$ ). Cnt: Control;  $J_{MAX}$ : maximum deformation;  $J_{\infty}$ : viscous part attributed to irreversible sliding of Maxwell dashpot;  $J_{KV}$ : elastic part related with Kelvin-Voigt unit;  $B$  and  $C$ : the parameters determining the recovery speed of system;  $R^2$ : determination coefficient of Eq. (8);  $R$ : final percentage recovery of system

### Proximate composition, spread ratio and color of cookies

The proximate composition, diameter, spread ratio and color results of *Chlorella vulgaris* incorporated cookies are given in Table 6. As expected, dry matter, protein, ash and fat content of cookies were significantly increased with increasing microalgae concentration ( $p < 0.05$ ), whereas carbohydrate amount did not change significantly. The freeze dried biomass consisted of 5.83±0.08% moisture, 9.85±0.02% ash, 53.75±0.09% protein, 14.09±0.45% lipid and 16.48±0.08% carbohydrate. The moisture content of cookies which ranged from 5.11 to 6.80% was typical such a dried product. The main effects of microalgae biomass addition were observed from protein, ash and fat content, since freeze dried biomass was rich in protein, ash and lipid. The diameter and spread ratio of cookies significantly increased by the microalgae addition, but increasing microalgae concentration did not affect the diameter and spread ratio. Abboud, vd. (1985) reported that the spread ratio of cookies was not affected by fat type. However, in another study the replacement of shortening with flaxseed oil significantly increased the spread ratio of cookies (Rangrej, vd., 2015). In our study, 13.41% shortening was used for cookie production and this amount is very low when compared to other methods (Egea, vd., 2014; Gouveia, vd., 2007; Rangrej, vd., 2015; Uribe-Wandurraga, vd., 2020).

Although we decreased the shortening amount during the production cookies, the increased spread ratio was probably due to the high fat content of the microalgae. Dinç, vd. (2014) stated that higher palmitic acid (C16:0) content made possible to interesterification and by this way palmitic acid had the tendency to crystallize in  $\beta'$  form which resulted in higher spread ratio. Large amounts of liquid oil in the crystal network can incorporate with  $\beta'$  crystals due to their relatively small size and therefore, smooth, continuous and homogenous products can be obtained (DeMan, 1994). It is earlier reported that *Chlorella sp.* consisted of 19.6% palmitic acid (Zhukova ve Aizdaicher, 1995), and therefore the addition of *Chlorella vulgaris* improved the spread ratio. The effect of defatted *Chlorella sp.* on spread factor of cookies was also reported by Sahni, vd. (2019), and they stated that the spreading of cookies can be attributed to the formation of syrup in the cookie dough during baking.

The surface and cross-sectional appearances of cookies were depicted in Fig. 6. It is clearly obvious that the addition of *Chlorella vulgaris* caused an apparent increase in green tonality. The color  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values of *Chlorella vulgaris* were determined as 20.69±1.59, 0.47±0.08 and 3.57±0.25, respectively. The control cookies presented a dominant yellow chromaticity (positive  $b^*$ ) for both inner and outer layer. The

incorporation of *Chlorella* biomass resulted in a darker and green color parameter. By increasing the *Chlorella* biomass concentration, lightness ( $L^*$ ) of inner and outer layer significantly decreased ( $p < 0.05$ ), which means that darker cookies were occurred. The increased level of *Chlorella* biomass significantly decreased the  $a^*$  value at inner layer, and green color ( $-a^*$  value) was dominant at 3%. However, at the inner layer of cookies, only control sample displayed positive  $a^*$  value, and the shift from positive to negative  $a^*$  value was observed depending on *Chlorella* biomass addition, and the greenness increased significantly ( $p < 0.05$ ). The higher  $-a^*$  value is typical due to high chlorophyll content of *Chlorella sp.*, as reported earlier by Batista, vd. (2017) and the addition of green and blue-green microalgae biomass decreases not only the red color ( $a^*$ ) but also the luminosity ( $L^*$ ) (Achour, vd., 2014; Figueira, vd., 2011). These results are similar to *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana* biomass

added cookie samples in which microalgae biomasses were used as colorants in cookies (Gouveia, vd., 2007; Gouveia, vd., 2008). As expressed by Şahin (2020), high carotene and chlorophyll content increased the  $b^*$  values of cookies. The  $b^*$  values of inner layer increased significantly when compared to control samples, whereas *Chlorella* addition did not cause a significant change. The total color changes ( $\Delta E$ ) of *Chlorella* incorporated cookies are also given in Table 6. Control sample without microalgae addition was used as reference and as seen, the addition of *Chlorella* biomass significantly increased the color change.  $\Delta E$  value can be classified as not noticeable (0-0.5), slightly noticeable (0.5-1.5), noticeable (1.5-3.0), well visible (3.0-6.0) and great (6.0-12.0) (Cserhalmi, vd., 2006). According to this classification, the inner and outer layers of cookie samples showed great color change ranging from 12.81 to 29.16 and 15.54 to 33.25, respectively.

Table 6. Proximate composition, spread ratio and color results of cookies

| Parameters               |            | Cookies                   |                           |                           |                           |
|--------------------------|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                          |            | Cnt                       | 0.5%                      | 1.5%                      | 3%                        |
| Proximate composition    |            |                           |                           |                           |                           |
| Moisture (%)             |            | 6.80±0.16 <sup>c</sup>    | 5.86±0.28 <sup>b</sup>    | 5.63±0.84 <sup>ab</sup>   | 5.11±0.58 <sup>a</sup>    |
| Ash (%)                  |            | 0.47±0.01 <sup>d</sup>    | 0.49±0.01 <sup>c</sup>    | 0.53±0.01 <sup>b</sup>    | 0.55±0.01 <sup>a</sup>    |
| Protein (%)              |            | 5.55±0.05 <sup>d</sup>    | 5.70±0.02 <sup>c</sup>    | 6.18±0.02 <sup>b</sup>    | 7.08±0.03 <sup>a</sup>    |
| Fat (%)                  |            | 12.35±0.01 <sup>d</sup>   | 12.51±0.01 <sup>c</sup>   | 12.81±0.06 <sup>b</sup>   | 13.37±0.11 <sup>a</sup>   |
| Carbohydrate (%)         |            | 74.83±0.23                | 75.45±0.30                | 74.85±0.72                | 73.89±0.77                |
| Physical characteristics |            |                           |                           |                           |                           |
| Diameter (cm)            |            | 6.18±0.13 <sup>b</sup>    | 6.43±0.04 <sup>a</sup>    | 6.53±0.03 <sup>a</sup>    | 6.54±0.08 <sup>a</sup>    |
| Spread ratio             |            | 3.65±0.08 <sup>b</sup>    | 4.14±0.20 <sup>a</sup>    | 4.16±0.10 <sup>a</sup>    | 4.19±0.14 <sup>a</sup>    |
| Color                    |            |                           |                           |                           |                           |
| Outer layer              | $L^*$      | 73.97±0.98 <sup>a</sup>   | 64.00±0.45 <sup>b</sup>   | 53.29±0.75 <sup>c</sup>   | 47.52±0.20 <sup>d</sup>   |
|                          | $a^*$      | 10.92±0.65 <sup>a</sup>   | 3.19±0.52 <sup>b</sup>    | 2.59±0.39 <sup>b</sup>    | -0.51±0.05 <sup>c</sup>   |
|                          | $b^*$      | 28.76±0.71 <sup>a</sup>   | 26.99±0.41 <sup>b</sup>   | 25.90±0.73 <sup>bc</sup>  | 24.59±0.66 <sup>c</sup>   |
|                          | $\Delta E$ | -                         | 12.81±0.86 <sup>c</sup>   | 22.51±0.75 <sup>b</sup>   | 29.16±0.35 <sup>a</sup>   |
| Inner layer              | $L^*$      | 80.91±2.02 <sup>a</sup>   | 71.92±0.34 <sup>b</sup>   | 56.61±1.13 <sup>c</sup>   | 50.66±0.71 <sup>d</sup>   |
|                          | $a^*$      | 2.21±0.82 <sup>a</sup>    | -3.93±0.30 <sup>b</sup>   | -5.11±0.50 <sup>b</sup>   | -7.90±0.66 <sup>c</sup>   |
|                          | $b^*$      | 19.65±1.09 <sup>b</sup>   | 30.51±0.94 <sup>a</sup>   | 29.78±1.20 <sup>a</sup>   | 28.88±1.08 <sup>a</sup>   |
|                          | $\Delta E$ | -                         | 15.54±0.83 <sup>c</sup>   | 27.39±0.58 <sup>b</sup>   | 33.25±1.32 <sup>a</sup>   |
| Texture profile analysis |            |                           |                           |                           |                           |
| Hardness (N)             |            | 198.69±10.81 <sup>c</sup> | 245.86±20.87 <sup>b</sup> | 273.84±6.62 <sup>b</sup>  | 330.86±33.96 <sup>a</sup> |
| Fracturability (N)       |            | 88.66±3.06 <sup>b</sup>   | 102.28±9.96 <sup>b</sup>  | 151.09±16.09 <sup>a</sup> | 165.18±16.54 <sup>a</sup> |
| Springiness              |            | 0.372±0.025 <sup>b</sup>  | 0.370±0.038 <sup>b</sup>  | 0.386±0.016 <sup>b</sup>  | 0.441±0.017 <sup>a</sup>  |
| Cohesiveness             |            | 0.030±0.006 <sup>c</sup>  | 0.062±0.018 <sup>b</sup>  | 0.079±0.007 <sup>b</sup>  | 0.101±0.008 <sup>a</sup>  |
| Gumminess                |            | 5.86±0.82 <sup>c</sup>    | 14.96±3.43 <sup>b</sup>   | 21.61±1.30 <sup>b</sup>   | 33.25±6.08 <sup>a</sup>   |
| Chewiness                |            | 2.19±0.38 <sup>c</sup>    | 5.53±1.41 <sup>bc</sup>   | 8.36±0.80 <sup>b</sup>    | 14.73±3.29 <sup>a</sup>   |
| Resilience               |            | 0.011±0.003 <sup>b</sup>  | 0.014±0.007 <sup>b</sup>  | 0.020±0.003 <sup>ab</sup> | 0.024±0.004 <sup>a</sup>  |

Values are means ± Standard Deviation. a-d Means within the same row with different letters are different ( $p < 0.05$ ).

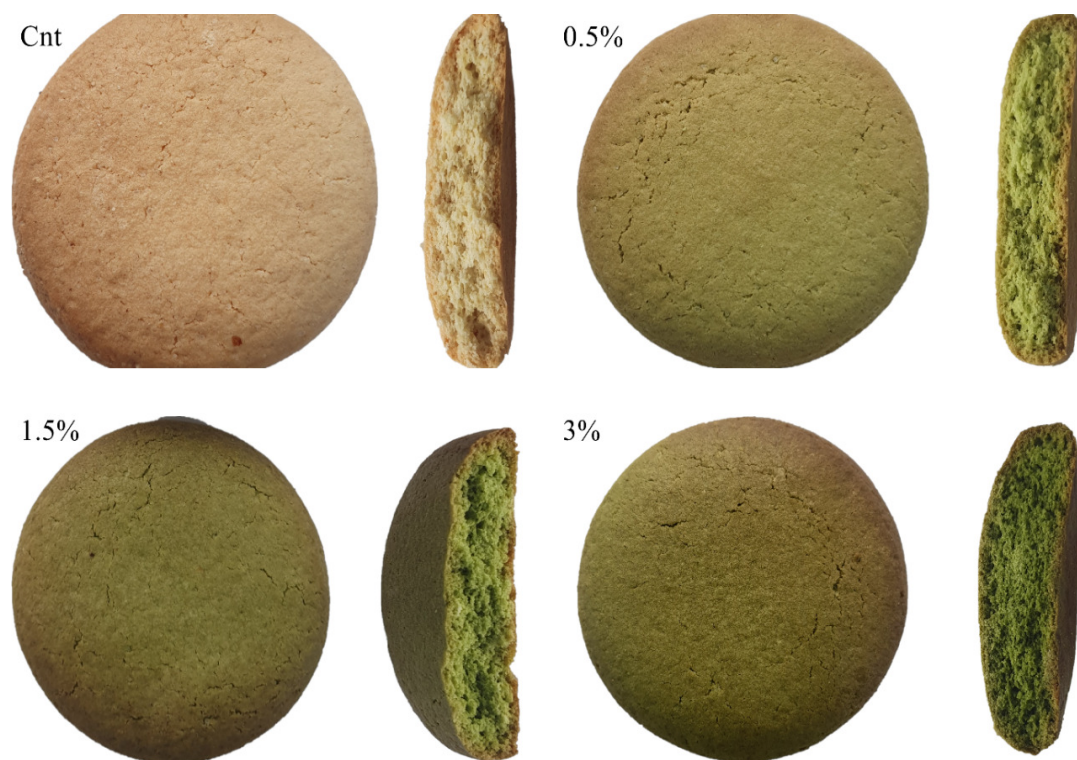


Fig. 6 Surface and cross-section visual appearances of baked low-fat cookies containing various amount of *Chlorella vulgaris*

### Texture profile analysis

The effect of *Chlorella vulgaris* on the textural properties of cookies is also illustrated in Table 6. Hardness and fracturability are important parameters for consumer acceptability of baked cookies, and can be determined as the peak force that occurs during the first compression. Springiness denotes how well a product physically springs back after the first deformation, whereas cohesiveness is defined as how well the product withstands a second deformation relative to resistance under the first compression. Gumminess and chewiness are applicable for semi-solid and solid products, respectively and they are calculated using the hardness scores of samples. Resilience is defined as how well a product fights to regain its original height (Anonymous, 2021). The lowest hardness (198.69 N) was observed from the control, while the highest value (330.86 N) was determined from 3% microalgae added sample. The increasing *Chlorella* concentration caused higher hardness, but

increasing concentration from 0.5 to 1.5% did not significantly increase the hardness. A linear and significant increase in hardness was also determined by Gouveia, vd. (2007) for cookies enriched with *Chlorella vulgaris* between 0.5 and 3% concentrations. Authors stated that protein and carbohydrate molecules of microalgae can play an important role on the water absorption, which promotes the firmness of cookies. In another study, the increasing concentration of defatted microalgae resulted in higher cookie hardness related with the ash content of cookie dough (Sahni, vd., 2019). Authors stated that gluten proteins in wheat constitute one third of glutamine and low content of acidic and basic amino acids which results in low charge density on protein surfaces. This low charge density surfaces of proteins makes them sensitive to mineral salts and mineral ions result in suppression of charge and allow molecular interactions via hydrogen bonding (Gujral, vd., 2008). Fracturability of cookies also increased

with microalgae addition. However, fracturability values were statistically similar for control and 0.5%, and 1.5 and 3%. Similar fracturability results were also reported by Bashir, vd. (2020) for cookies produced with pearl millet and flaxseed flour. The highest springiness, cohesiveness, gumminess and chewiness values were observed from 3% *Chlorella* incorporated sample, whereas the lowest values were determined from control. Resilience results of cookies increased insignificantly up to 3% microalgae addition, and these results were also in accordance with the recovery percentage (Table 5) which 3% *Chlorella vulgaris* added cookie dough showed the highest %R value.

### Sensory properties

The sensorial evaluations of cookies produced with *Chlorella vulgaris* at various concentrations are provided in Fig. 7. Cross-section appearance, taste, overall acceptability and affordability scores of cookies containing 0.5 and 1.5% microalgae did not significantly change when compared with

control. However, the highest surface appearance was detected from the sample containing 0.5% *Chlorella*. The increasing concentration of microalgae at 3% significantly decreased all the sensorial properties, except for texture which decreased insignificantly. It is clear in the Fig. 7 that *Chlorella vulgaris* addition at 0.5 and 1.5% reached nearly 7 point for all sensorial attributes which shows consumers decided as “like moderately”. Texture scores of samples were negatively in accordance with the hardness which increased with microalgae concentration while texture decreased. It can be concluded from the sensorial scores that 0.5 and 1.5% of *Chlorella* could be well used for the production of low-fat cookies, whereas 3% addition is less acceptable. The results of sensory analyses of microalgae based products such as cookies (Egea, vd., 2014; Sahni, vd., 2019), pasta (Fradique, vd., 2013; Zouari, vd., 2011) and yoghurt (Dubey ve Kumari, 2011) were in accordance with our findings.

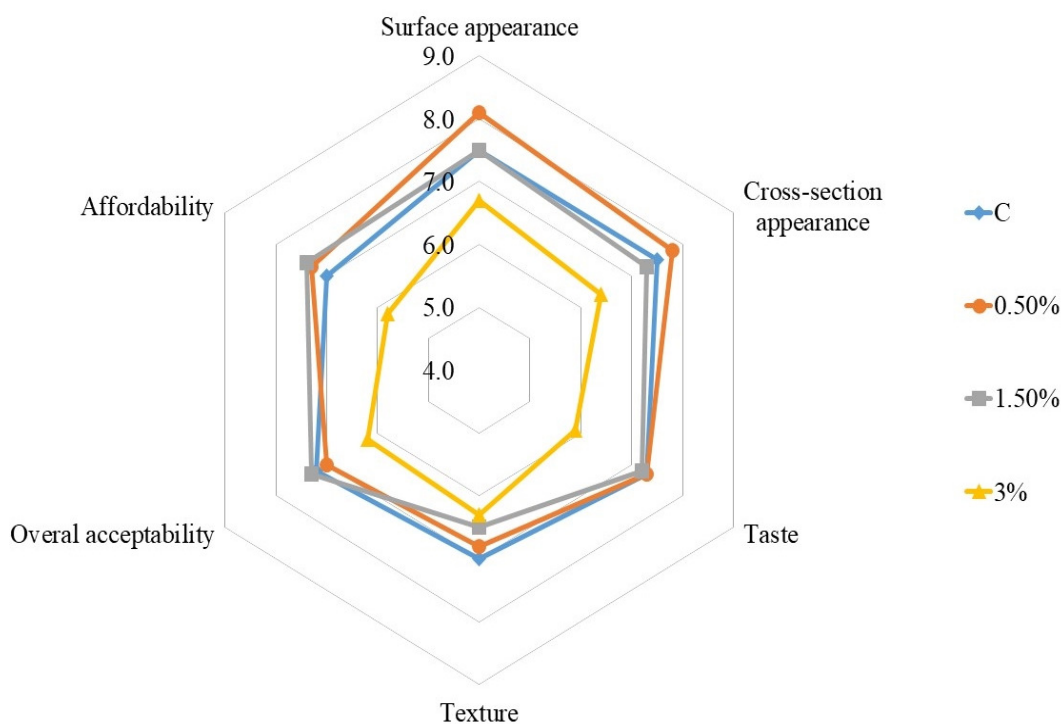


Fig. 7 The effect of *Chlorella vulgaris* addition on sensorial properties of low-fat cookies

**CONCLUSIONS**

Different concentrations of microalgae addition to the reduced-fat cookies significantly affected the properties of both cookie dough and cookies. Cookie doughs displayed viscoelastic characteristic due to higher  $G'$  than  $G''$ , and the increasing microalgae concentration significantly improved the viscoelasticity of doughs. Non-linear regression results and curves of 3ITT showed that the addition of *Chlorella* to cookie doughs improved the recovery of samples after high shear deformations such as processing, shaping and handling. Burgers and exponential decay models well explained the creep and recovery data, and via these tests the internal structure and elastic and viscous behavior of cookie doughs were better understood, and also the recovery results were in accordance with 3ITT results. Microalgae incorporation significantly increased the protein, ash and fat content of cookies, as well as spread ratio. *C. vulgaris* incorporated cookies presented mainly green tonalities that became significantly darker ( $L^*$ ), greener ( $a^*$ ) and less yellow ( $b^*$ ) when increasing biomass concentration, and the inner and outer layers of cookies showed great total color differences ( $\Delta E > 12$ ). *Chlorella* incorporation provided a significant structuring effect, in terms of cookies texture. Moreover, 0.5 and 1.5% microalgae added cookies sensorial pointed as nearly 7 for all sensorial attributes which means consumers “liked moderately” to cookies. This study suggests that low-fat cookies could be produced by using *Chlorella vulgaris* at 0.5 or 1.5%, and microalgae can also be considered as a suitable ingredient, enhancing textural, rheological and physical properties of low-fat cookies. In addition, with the improvement of sensory qualities with increasing microalgae concentration up to 1.5%, microalgae based low-fat cookies may become widely appreciated and consumed functional foods in the future.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

This research received grant from Bursa Technical University Scientific Research Projects with the number of 211N029.

**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 paper.

**AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

Ayşe Neslihan Dundar: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing-Review & Editing. Oya Irmak Sahin: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing-Review & Editing. Furkan Turker Saricaoglu: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing-Original Draft, Visualization.

**REFERENCES**

- Abboud, A., Rubenthaler, G., Hosney, R. C. (1985). Effect of fat and sugar in sugar-snap cookies and evaluation of tests to measure cookie flour quality. *Cereal Chemistry*, 62(2), 124-129
- Achour, H., Doumandji, A., Sadi, S., Saadi, S. (2014). Evaluation of nutritional and sensory properties of bread enriched with Spirulina. *Annals Food Science and Technology*, 15, 270-275
- Aguirre, A. M., Bassi, A. (2013). Investigation of biomass concentration, lipid production, and cellulose content in *Chlorella vulgaris* cultures using response surface methodology. *Biotechnology and bioengineering*, 110(8), 2114-2122
- Anonymous. (2021). <https://texturetechnologies.com/resources/text-ure-profile-analysis>. In (Vol. 2021).
- Bashir, S., Yaseen, M., Sharma, V., Purohit, S. R., Barak, S., Mudgil, D. (2020). Rheological and textural properties of gluten free cookies based on pearl millet and flaxseed. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 10, 6565-6576
- Batista, A. P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I., Raymundo, A. (2017). Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Research*, 26, 161-171. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.017>



- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, Á., Tóth-Markus, M., Lechner, N. (2006). Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1), 49-54. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.07.001>
- DeMan, L. (1994). *Functionality of palm oil, palm oil products and palm kernel oil in margarine and shortening*. Kuala Lumpur: Institut Penyelidikan Minyak Kelapa Sawit Malaysia, 1994.
- Dimitreli, G., Thomareis, A. S. (2008). Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. *Journal of Food Engineering*, 84(3), 368-374. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.05.030>
- Dinç, S., Javidipour, I., Özbas, Ö. Ö., Tekin, A. (2014). Utilization of zero-trans non-interesterified and interesterified shortenings in cookie production. *Journal of Food Science and Technology*, 51(2), 365-370. [10.1007/s13197-011-0506-x](https://doi.org/10.1007/s13197-011-0506-x)
- Dolz, M., Hernandez, M. J., Delegido, J. (2008). Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22(3), 421-427. [10.1016/j.foodhyd.2006.12.011](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.011)
- Dubey, R. P., Kumari, P. V. (2011). Preparation of low fat and high protein frozen yoghurt enriched with papaya pulp and Spirulina. *Trends in Biosciences*, 4, 182-184
- Egea, B., Campos, A., De Carvalho-Eliane, J., Danesi, D. (2014). Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with Spirulina platensis and sources of fibre. *Journal of Food and Nutrition Research*, 53(2), 171-179
- Everitt, M. (2009). CHAPTER 8 - Consumer-Targeted Sensory Quality. In G. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle ve P. Colonna (Eds.), *Global Issues in Food Science and Technology* (pp. 117-128). San Diego: Academic Press.
- Figueira, F. d. S., Crizel, T. d. M., Silva, C. R., Salas-Mellado, M. d. I. M. (2011). Elaboration of gluten-free bread enriched with the microalgae Spirulina platensis. *Brazilian Journal of Food Technology*, 14(4), 308-316
- Fradinho, P., Nunes, M. C., Raymundo, A. (2015). Developing consumer acceptable biscuits enriched with Psyllium fibre. *Journal of food science and technology*, 52(8), 4830-4840
- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Raymundo, A. (2013). Isochrysis galbana and Diacronema vlkianum biomass incorporation in pasta products as PUFA's source. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1), 312-319
- Gouveia, L., Batista, A. P., Miranda, A., Empis, J., Raymundo, A. (2007). Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 433-436. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.026>
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M., Raymundo, A. (2008). Functional biscuits with PUFA- $\omega$ 3 from Isochrysis galbana. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(5), 891-896. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3166>
- Graça, C., Fradinho, P., Sousa, I., Raymundo, A. (2018). Impact of Chlorella vulgaris on the rheology of wheat flour dough and bread texture. *LWT*, 89, 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.024>
- Gujral, H. S., Park, S. J., Baik, B.-K. (2008). Effects of Added Minerals on Pasting of Partial Waxy Wheat Flour and Starch and on Noodle Making Properties. *Cereal Chemistry*, 85(2), 97-101. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-2-0097>
- Hajas, L., Sipos, L., Csobod, É. C., Bálint, M. V., Juhász, R., Benedek, C. (2022). Lentil (Lens culinaris Medik.) Flour Varieties as Promising New Ingredients for Gluten-Free Cookies. *Foods*, 11(14), 2028
- Huang, M.-s., Zhang, M., Bhandari, B. (2019). Assessing the 3D Printing Precision and Texture Properties of Brown Rice Induced by Infill Levels and Printing Variables. *Food and Bioprocess Technology*, 12(7), 1185-1196. [10.1007/s11947-019-02287-x](https://doi.org/10.1007/s11947-019-02287-x)

- Huang, M.-s., Zhang, M., Bhandari, B., Liu, Y. (2020). Improving the three-dimensional printability of taro paste by the addition of additives. *Journal of Food Process Engineering*, 43(5), e13090. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13090>
- Isanga, J., Zhang, G. (2009). Production and evaluation of some physicochemical parameters of peanut milk yoghurt. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1132-1138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.01.014>
- Kurt, A., Cengiz, A., Kahyaoglu, T. (2016). The effect of gum tragacanth on the rheological properties of salep based ice cream mix. *Carbohydrate Polymers*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.018>
- Laguna, L., Varela, P., Salvador, A., Sanz, T., Fiszman, S. M. (2012). Balancing Texture and Other Sensory Features in Reduced Fat Short-Dough Biscuits. *Journal of Texture Studies*, 43(3), 235-245. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2011.00333.x>
- Özboy-Özbaş, Ö., Seker, I. T., Gökbulut, I. (2010). Effects of resistant starch, apricot kernel flour, and fiber-rich fruit powders on low-fat cookie quality. *Food Science and Biotechnology*, 19(4), 979-986
- Peressini, D., Sensidoni, A. (2009). Effect of soluble dietary fibre addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 49(2), 190-201. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.09.007>
- Pulatsu, E., Su, J.-W., Kenderes, S. M., Lin, J., Vardhanabuthi, B., Lin, M. (2021). Effects of ingredients and pre-heating on the printing quality and dimensional stability in 3D printing of cookie dough. *Journal of Food Engineering*, 294, 110412. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110412>
- Rangrej, V., Shah, V., Patel, J., Ganorkar, P. M. (2015). Effect of shortening replacement with flaxseed oil on physical, sensory, fatty acid and storage characteristics of cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3694-3700. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1430-7>
- Rao, M. A., Cooley, H. J. (1992). Rheological behavior of tomato pastes in steady and dynamic shear. *Journal of Texture Studies*, 23(4), 415-425. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1992.tb00031.x>
- Rosell, C. M., Rojas, J. A., Benedito de Barber, C. (2001). Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. *Food Hydrocolloids*, 15(1), 75-81. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00054-0)
- Sahni, P., Sharma, S., Singh, B. (2019). Evaluation and quality assessment of defatted microalgae meal of Chlorella as an alternative food ingredient in cookies. *Nutrition & Food Science*, 49(2), 221-231. <https://doi.org/10.1108/nfs-06-2018-0171>
- Šaponjac, V. T., Četković, G., Čanadanović-Brunet, J., Pajin, B., Djilas, S., Petrović, J., Lončarević, I., Stajčić, S., Vulić, J. (2016). Sour cherry pomace extract encapsulated in whey and soy proteins: Incorporation in cookies. *Food chemistry*, 207, 27-33
- Saricaoglu, F. T., Cinar, A., Demircan, H., Oral, R. A. (2019). Rheological and microstructural characterization of royal jelly at different temperatures. *Journal of Food Process Engineering*, 42(8), e13285. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13285>
- Soares, I. D., Cirilo, M. E. M., Junqueira, I. G., Vanin, F. M., Rodrigues, C. E. d. C. (2023). Production of Cookies Enriched with Bioactive Compounds through the Partial Replacement of Wheat Flour by Cocoa Bean Shells. *Foods*, 12(3), 436
- Sokmen, O., Ozdemir, S., Dundar, A. N., Cinar, A. (2022). Quality properties and bioactive compounds of reduced-fat cookies with bee pollen. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 29, 100557
- Sozer, N. (2009). Rheological properties of rice pasta dough supplemented with proteins and gums. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 849-855. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.03.016>
- Steffe, J., F. (1996). *Rheological Methods in Food Process Engineering* (Second edition ed.). Michigan, ABD: Freeman Press.



- Şahin, O. I. (2020). Functional and sensorial properties of cookies enriched with SPIRULINA and DUNALIELLA biomass. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 3639-3646
- Uribe-Wandurraga, Z. N., Igual, M., Reino-Moyón, J., García-Segovia, P., Martínez-Monzó, J. (2020). Effect of Microalgae (*Arthrospira platensis* and *Chlorella vulgaris*) Addition on 3D Printed Cookies. *Food Biophysics*, 16(1), 27-39. [10.1007/s11483-020-09642-y](https://doi.org/10.1007/s11483-020-09642-y)
- Vieira, M. V., Oliveira, S. M., Amado, I. R., Fasolin, L. H., Vicente, A. A., Pastrana, L. M., Fuciños, P. (2020). 3D printed functional cookies fortified with *Arthrospira platensis*: Evaluation of its antioxidant potential and physical-chemical characterization. *Food Hydrocolloids*, 107, 105893. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105893>
- Yang, Y., Guan, E., Zhang, T., Li, M., Bian, K. (2019). Influence of water addition methods on water mobility characterization and rheological properties of wheat flour dough. *Journal of Cereal Science*, 89, 102791. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102791>
- Zhukova, N. V., Aizdaicher, N. A. (1995). Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry*, 39(2), 351-356. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00913-E](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00913-E)
- Zouari, N., Abid, M., Fakhfakh, N., Ayadi, M., Zorgui, L., Ayadi, M., Attia, H. (2011). Blue-green algae (*Arthrospira platensis*) as an ingredient in pasta: free radical scavenging activity, sensory and cooking characteristics evaluation. *International journal of food sciences and nutrition*, 62(8), 811-813
- Zoulias, E. I., Oreopoulou, V., Kounalaki, E. (2002). Effect of fat and sugar replacement on cookie properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(14), 1637-1644. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1230>
- Zoulias, E. I., Piknis, S., Oreopoulou, V. (2000). Effect of sugar replacement by polyols and acesulfame-K on properties of low-fat cookies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(14), 2049-2056



## ŞEKER EKSTRAKSİYONUNDA VURGULU ELEKTRİK ALAN UYGULAMA POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elif Esra İşgüzar<sup>\*1</sup>, Mustafa Fincan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri, Türkiye

Geliş / Received: 06.12.2022; Kabul / Accepted: 29.03.2023; Online baskı / Published online: 24.04.2023

İşgüzar, E. E., Fincan, M. (2023). Şeker ekstraksiyonunda vurgulu elektrik alan uygulama potansiyelinin değerlendirilmesi. GIDA (2023) 48 (3) 545-561 doi: 10.15237/ gida.GD22125

İşgüzar, E. E., Fincan, M. (2023). Potential use of pulsed electric fields in sugar extraction. GIDA (2023) 48 (3) 545-561 doi: 10.15237/ gida.GD22125

### ÖZ

Şeker ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan ısı işlem, yüksek enerji tüketimine ve ısıya bağlı bazı istenmeyen reaksiyonların oluşumuna yol açmaktadır. Özellikle, kullanılan enerji miktarı ve ısıya bağlı safsızlıkları şerbetten uzaklaştırmak için ek bir saflaştırma işleminin gerekliliği, nihai ürünün fiyatına olumsuz katkıda bulunmaktadır. Vurgulu elektrik alanları (PEF), bu olumsuz sonuçları azaltmanın bir aracı olarak ekstraksiyonda kullanılmak üzere önerilen termal olmayan ve düşük enerjili bir doku parçalanma yöntemidir; Bu alandaki çalışmalar günümüze kadar artarak devam etmektedir. Bu derlemede, PEF tekniğinin altında yatan temel ilkelerin yanı sıra şeker ekstraksiyonundaki potansiyel uygulama yöntemleri ve bunların ekstraksiyon üzerindeki etkileri hakkında genel bir bakış sunmak için önceki araştırmaların bulguları özetlenmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Vurgulu elektrik alan, şeker pancarı, sıvı-katı ekstraksiyon, elektroporasyon

### POTENTIAL USE OF PULSED ELECTRIC FIELDS IN SUGAR EXTRACTION

#### ABSTRACT

Widespread use of heat treatment in sugar extraction results in high energy consumption and some undesirable reactions due to the heat. In particular, the amount of energy used and the necessity of an additional treatment process to remove heat-related impurities from the sorbet contribute negatively to the price of the final product. Pulsed electric fields (PEF) are a non-thermal and low-energy tissue breakdown method that has been proposed for use in extraction as a means of reducing these negative outcomes; studies into this area have been expanding to the present day. This review summarizes the findings of prior research to present an overview of the fundamental principles underlying the PEF technique, as well as its potential application methods in sugar extraction and their effects on extraction.

**Keywords:** Pulsed electric field, sugar beet, solid-liquid extraction, electroporation

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: elifesra24@gmail.com

☎: (+90) 506 413 96 67

☎: (+90) 352 437 57 84

Elif Esra İşgüzar; ORCID no: 0000-0002- 3335-2083

Mustafa Fincan; ORCID no: 0000-0002-9394-6449

## GİRİŞ

Bitkisel dokulardan şeker gibi hücre içi bileşikleri ekstrakte etmede ürün maliyetine etki eden önemli faktörlerden biri doku bozundurma veya hücre parçalama yöntemidir. Isıl işlem ile dokunun bozundurulup, ekstraksiyonun sağlanması geleneksel şeker üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Dastango vd. 2020). Bununla birlikte ısıl işlem özellikleri itibarıyla yüksek enerji sarfiyatı gerektirmesinden ve ayrıca saflaştırma aşamasında çeşitli zorluklara yol açmasından (ısıl işlem nedeniyle şerbet renginde koyulaşma ve pektin gibi bileşenlerin şerbete geçişiyle şerbet saflılığının artması) ürün maliyeti içinde önemli bir yekûn oluşturmaktadır (Putnik vd., 2019; Timmermans vd., 2022). Isıl işlemle ortaya çıkan bu dezavantajları azaltmaya yönelik şeker endüstrisi daha ekonomik, daha verimli, daha az kimyasal kullanımı gerektiren bir doku bozundurma prosesi arayışı içerisinde. Son yıllarda ortaya çıkan PEF tekniğinin enerji maliyeti düşük ve ısısal olmayan bir doku bozundurma yöntemi olduğu birçok çalışmada gösterilmiş ve şeker ekstraksiyonundaki bu olumsuzlukları azaltmaya yönelik potansiyel taşıdığı öne sürülmüştür (Xi vd., 2021; Vorobiev ve Lebovka, 2022).

Taze meyve ve sebzelerden, şeker gibi değerli intrasellüler bileşenlerin dış ortama aktarılması (ekstraksiyon) istenildiğinde, aktarım bir takım yapısal unsurlar tarafından engelleme ile karşılaşmaktadır. Doku kalınlığı, hücre duvarı gibi bazı unsurlar aktarıma belli düzeyde engel olurken, esas direnç sağlam hücre zarından kaynaklanmaktadır (Khan vd., 2018). Diğer bir deyişle, aktarımın başlaması için, fizyolojik şartlarda geçirgen olmayan dış hücre zarının öncelikle bozundurulması gerekmektedir. Bir genelleme yapılırsa, zarla tahribat düzeyi ne kadar fazla olursa, bu hücre dışına çıkışı kolaylaştırıp, verime olumlu yansımaktadır. Bu sebepten, taze meyve sebzelerden ekstraksiyonu hedefleyen kurutma ve katı sıvı ekstraksiyonu gibi birçok prosesden önce bir hücre parçalama/doku bozundurma ön işleminin gerekliliği ortaya çıkmaktadır (Fincan, 2015; Chaves vd., 2020; Baoguo vd., 2022). Isıl işlem, dondurup çözündürme ve öğütme gibi geleneksel ön işlem

yöntemleri eskiden beri kullanılmakta iken son yıllarda yüksek basınç (Duan vd., 2022; Li vd., 2020; Limsangouan vd., 2020), mikrodalga (Mirzadeh vd., 2020; Shashikant ve Mayur, 2021, Oroian vd.,2020), ultrases (Marić vd., 2018; Xu vd., 2021; Kumar vd., 2021) ve vurgulu elektrik alanı (Barros vd., 2022; Visockis vd., 2021; Jiang vd., 2022) gibi yeni yöntemlerin etkileri de yoğun olarak araştırılmaktadır. Bu ön işlemlerin her biri hücre zarını tahrip etkisi yanında, istenmeyen bazı yan etkiler de doğurabilmektedir. Bu etkilerin düzeyi, genellikle ön işlem yönteminin çeşidi ve şiddeti ile ilintili olmakla beraber, uygulandığı süreç ve doku çeşidine de bağlı olarak değişmekte, avantajlar veya dezavantajlar ortaya çıkmaktadır (Chemat, 2017; Xin vd., 2020; Deng vd., 2022). Örneğin; 80-100 °C'de 1-10 dakika süren ısıl işlem, hücre zarlarının etkin bir bozunumunu ve enzimlerin inaktivasyonunu sağlarken, eğer ekstrakte edilmek istenen madde ısı ile bozunuyorsa, ekstraksiyon veriminde azalmaya yol açmaktadır (Şengül ve Topdaş, 2019; Zia vd.2020; Garcia ve Raghavan, 2021).

## ŞEKERİN EKSTRAKSİYONUNDA ISIL İŞLEMİN DEZAVANTAJLARI

Şeker ekstraksiyonunda hücre bozundurma işlemi kullanılan üretim teknolojisine göre değişiklik gösterebilmektedir. Geçmiş çalışmalara bakıldığında iki farklı yöntem öne çıkmaktadır. Bunlardan biri yaygın olarak kullanılan geleneksel şeker üretim teknolojisinde ısıl işlem ile bozundurma, diğeri daha seyrek kullanılan mekanik presleme yolu ile hücre zarlarının bozundurulmasıdır. Sonraki yöntemde presden elde edilen doku sıvısı rafine edilirken, birinci yöntem ısıl işlem eşliğinde bir sıvı-katı ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntemde, pul haline getirilmiş dokular önce 85-90 °C'de yaklaşık 10 dakika ısıl işleme maruz bırakılarak bozundurulmakta, sonra 70-75 °C'deki ters akımlı su içerisinde yaklaşık 60-90 dakika daha ısıl işleme uğratıldıklarında, şeker ve şeker dışı safsızlıklar su içerisine difüze olmakta ve rafine edilecek şerbet elde edilmektedir. Şeker dışı bu safsızlıkların (pektin, amino asitler, mineraller vb.) daha sonraki bir rafinasyon basamağında kireç kullanılarak ayrıştırılıp, uzaklaştırılmaktadır (Muir, 2022). Dolayısıyla sıvı-katı ekstraksiyon basamağında

oluşan safsızlıklar, bir sonraki rafinasyon basamağını etkilemekte, safsızlıklar arttıkça ayrıştırılmaları için gereken kimyasal ihtiyacı da artmakta, bu da ürün maliyetine yansımaktadır (El-Belghiti vd., 2005; Vu vd., 2020). Ekstraksiyon soğuk yöntemle yapılsa bile, şerbette safsızlıkların olacağı aşıkardır, bununla birlikte bu geleneksel sıcak yöntemde ısının tetikleyerek oluşturduğu safsızlıklar öne çıkmaktadır. Isıl işlem özellikle hücre duvarı bileşenlerinde zincirlerin kırılması ve bazı polisakarit ünitelerinin ayrışmasına (hidrolitik degradasyon) yol açmaktadır (Bhattacharjee vd., 2019; Loginova vd., 2011). Orta lamel ve hücre duvarında bulunan pektin kolaylıkla şerbet içeresine geçmeye başlamaktadır. Maillard reaksiyonları meydana gelerek melanoidin gibi renk maddeleri oluşmakta ve şerbete geçen bu renk maddelerini ayrıştırmak için saflaştırma aşamasında ilave yüksek miktarda kireç kullanımı gerekmektedir (3-3.2 kg kireç/100 kg şeker pancarı) (Wang vd., 2020; Loginova vd., 2011). Ayrıca ısıl işlem sakkoroza parçalayan termofilik mikroorganizmanın gelişimini destekleyerek verimde düşmelere yol açmaktadır (Lopez vd., 2009). Bundan başka, ısıl işlem bazlı ekstraksiyonun diğer bir dezavantajı yüksek enerji sarfiyatına sahip olmasıdır, buda doğrudan ürün maliyetine artış olarak yansımaktadır. Isıyla hem doku bozundurma hem de ekstraksiyon basamakları dahil edildiğinde, enerji sarfiyatı yaklaşık 175 kJ/kg işlem görmüş pancar olarak hesaplanmıştır (Schultheiss vd., 2002; Nakthong ve Eshtiaghi, 2020). Isıl işlemler, sıcak ekstraksiyonun ortaya çıkardığı bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için, soğuk ekstraksiyon alternatifini geçmişte farklı kimyasallar kullanarak çeşitli çalışmalara konu olmuştur. Bu çalışmalarda soğuk ekstraksiyon ortamında hücre bozunumunu gerçekleştirmek için, asitlik veya alkalilik seviyesi artırılmış ve/veya sıvı amonyak, elektrik alan uygulaması denenmiştir. İlâveten, şeker pancarı dilimlerinden katı-sıvı ekstraksiyon (presleme) 50-100 bar (Bliesener vd., 1991a) veya alkali ortam şartları altında da test edilmiştir Ponant vd., 1988). Yetersiz doku bozunma oranı, şerbete geçen kireç tuzunun yüksekliği ve melas da kötüleşme gibi çeşitli sebeplerden, bu farklı yöntemler başarılı olmamıştır (Loginova vd., 2011). Şeker ekstraksiyonunu iyileştirmek için

yapılan diğer bir çalışmada; ultrasonik destekli ekstraksiyon ile ekstraksiyon süre ve sıcaklığında düşüş ve daha yüksek saflıkta ve verimde ham şerbet elde edilmiştir (Xiong Fu vd., 2013).

Yeni doku bozundurma yöntemlerinden, vurgulu elektrik alan (PEF) tekniğinin, ısıl işlemin oluşturduğu bu olumsuz etkileri şeker ekstraksiyonunda da azaltabileceğine dair çalışmalar son yıllarda birçok çalışmaya konu olmuştur. Etkinin daha çok PEF in hücreleri ısıl olmayan bir şekilde, düşük enerji sarfiyatı ile etkin bir şekilde parçalama özelliğinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Çalışmaların bir kısmında, PEF işlemi görmüş dokudan şekerin eldesi sıvı-katı ekstraksiyon sisteminde incelenirken (Jemai ve Vorobiev, 2003; El-Belghiti vd., 2005; Loginova vd., 2011) diğer bir kısmında mekanik presle elde edilen pancar suyunda şeker yüzdesi konu edinilmiştir (Eshtiaghi ve Knorr 2002; Mhemdi vd., 2016). Birçok çalışmada, PEF in ekstraksiyon verimini artırdığı, enerji sarfiyatını azalttığı ve saflaştırma aşamasında kimyasal kullanım gerekliliğini düşürdüğü vurgulanmıştır (Jemai ve Vorobiev 2006; Mhemdi vd., 2016).

### VURGULU ELEKTRİK ALAN (PEF) TEKNİĞİ

Gıda işlemede PEF tekniği terimi aslında geçmişte gen aktarımında kullanılan yöntemlerden biri olan ve elektroporasyon olarak bilinen tekniğin daha geniş anlamda kullanımını ifade etmektedir. Basit anlamda PEF elektrotlar arasına alınan hücre sistemlerine kesikli/vurgulu DC voltaj uygulamasıdır (Tylewicz, 2020). Etki mekanizması halen tam olarak açıklanamasa bile, uygulamanın hücre zarında kalıcı veya geçici bozunuma yol açtığı gösterilmiş, bozunumun elektriksel ve ortam özelliklerinden etkilendiği belirlenmiştir (Ricci vd., 2018; Genovese vd.,2021).

### PEF Uygulamasında Hücre Bozunumu

En yaygın kabul edilen dielektrik parçalanma teorisine göre; PEF uygulaması sürdükçe, dielektrik hücre zarının iç ve dış yüzeylerinde zıt yükler polarize olarak, transmembran potansiyeli (TMP) artışına yol açmaktadır. TMP 1V'u aştığında, zıt yüklerin zarı sıkıştırması gözenek oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Gözenek oluşumu

ilk aşamada geçici olurken, PEF işleminin sürdürülmesi halinde hücre zarı kalıcı mekanik hasara uğrayarak, kalıcı gözenek oluşumu meydana gelmektedir (Zimmerman, 1974; Zhang vd., 2021). Özellikle dokuların kalıcı elektroporasyonu söz konusu olduğunda, hücre zarı deformasyon derecesi veya gözenek büyüklük seviyesi kritik olmaktadır, çünkü deformasyon arttıkça intrasellüler maddelerin çıkışı kolaylaşmaktadır (Mman vd., 2021). Deformasyon derecesi başta PEF in elektriksel parametrelerinden, (elektrik alan şiddeti, vurgu sayısı, vurgu genişliği ve vurgu frekansı) etkilenirken (Giteru vd., 2018; Roobab vd., 2022), sıcaklık ve elektriksel iletkenlik gibi ortam parametrelerinden de etkilenmektedir (Gabric vd., 2018; Ruzgys vd., 2019). Örneğin, milisaniye ölçekli vurgu genişliklerinin, mikro saniyeli olanlardan hücre zarında daha büyük gözenek oluşturduğu gözlenmiş, benzer bir sonuç vurgu sayısı artırıldığında bulunmuştur (Ghosh vd., 2019; Semenoglou vd., 2020). Bundan başka, PEF uygulamada önemli bir oranda ısı oluşturmaması için ortam elektriksel iletkenliği de önem taşımaktadır. Yüksek iletkenliğe sahip ortama PEF uygulamasında, ohmik ısı artışı yükselirken, düşük hücre parçalama oranı ve elektroliz gibi elektrolitik etkiler ortaya çıkmaktadır (Zimmerman, 1986; Astráin-Redín vd., 2022). Ortam sıcaklığı 55 °C dereceye kadar arttığında, hücre bozunumu için gereken PEF şiddeti azalmaktadır. Sıcaklığın hücrenin lipid kısmını yumuşatarak, bozunmaya karşı direncinin azalttığı şeklinde açıklanmaktadır. 55 °C üzerinde ki sıcaklıklarda hücre zarlarına kalıcı bozunum arttığından PEF in etkiside azalmaktadır (Stanley, 1991; Vorobiev ve Lebovka, 2019). Hücre bozunumu için gereken PEF şiddeti, genellikle hücre çapı küçüldükçe artmaktadır. 50-300 µm çapındaki bitkisel hücreler için, 0.5-2 kV/cm alan şiddeti yeterli iken 1-10 µm çaplı mikroorganizmaların inaktivasyonu için gereken elektrik alan şiddeti 10-60 kV/cm değerlerine çıkmaktadır (Niu vd., 2020; Soltanzadeh vd., 2020). PEF şiddetinin bu aralıklarda değişmesi, ortam ve elektriksel şartlara bağlı olarak da değişmekte olup, örneğin benzer ortam şartlarında tam parçalama birçok farklı elektriksel

değişken kombinasyonunda sağlanabilmektedir (Khursheed vd., 2021; Dastango vd., 2020).

Hücre parçalamayı amaçlayan birçok gıda prosesinde, örneğin pastörizasyonda (Kantala vd., 2022; Šalašević vd., 2021; Wu ve Chang, 2022) bitkisel/hayvansal dokulardan ekstraksiyonda (Visockis vd., 202; Bocker ve Silva, 2022; Einarsdóttir vd., 2022), kurutmada (Rahaman vd., 2019; Yamakage vd., 2021; Shorstki vd., 2020) ve enzim inaktivasyonunda (Fujivara vd., 2021; Samaranayake vd., 2022; Manzoor vd., 2020), PEF tekniğinin ürün ve proses verimi iyileştirici potansiyeli üzerinde durulmaktadır. Bu yararların birçoğu PEF in hücre zarında önemli bir ısı artışı olmadan ve düşük enerji sarfiyatı ile gözenek oluşturma özelliğine bağlanmaktadır. Genellikle enerji sarfiyatının en düşük seyrettiği seviye göz önüne alınarak tam parçalamayı sağlayacak elektriksel değişkenlerin optimizasyonu çalışmalarda göz önüne alınmaktadır (Martinez vd., 2020; Mahn vd., 2022).

Kırmızı pancardan PEF yolu ile betanin ekstraksiyonunu konu edinen diğer bir çalışmada, 1 kV/cm de 10 µs'lik karesel monopolar vurgulardan 270 adet kullanıldığında, doku bütüne yakın parçalanmış, toplam enerji sarfiyatı 7 kJ/kg olarak hesaplanmıştır (Fincan vd., 2004). Benzer şekilde 2 kV/cm'de 3 adet vurgu kullanıldığında 2.53 kJ/kg enerji sarfiyatıyla oda sıcaklığında 60 dakikada mevcut betaninlerin %70'inin ekstrakte edilebileceği gösterilmiştir (Visockis vd., 2021). Başka bir çalışmada, silindirik pancar dokusuna 4.38 kV/cm'de 20 vurgu sayısı ve toplam enerji sarfiyatı 4.10 kJ/kg olan PEF uygulamasıyla betanin ve vulgaksantin ekstraksiyonunda kontrole kıyasla verimlerde sırasıyla %329 ve %244 oranında bir artışın gözlemlendiği bildirilmiştir (Nowacka vd., 2019).

#### **Doku Bozunum Oranının Belirlenmesi**

Enerji sarfiyatının yanında, PEF veya diğer herhangi bir ön işlem uygulamasının dokuyu hangi oranda bozduğu veya dokudaki n adet hücrenin yüzde kaçının bozunduğu/geçirgenleştirildiğinin belirlenmesi ekstraksiyon veriminin optimizasyonu açısından önem

taşımaktadır. İdeal şartlarda, ön işlemin bütün hücreleri bozundurması, böylece hücre içi muhtevanın hücre zarından kaynaklı engeline uğramadan dış ortama çıkabilecek hale gelmesi genellikle istenen bir durumdur. Bu sebepten, herhangi bir şiddetteki ön işlemin dokuyu hangi oranda bozduğunu belirlemek için çeşitli yöntemler geliştirilmiş, bunlar sık sık doku parçalama endeksi (Z) olarak adlandırılmışlardır (Zhang vd., 2023). Doku parçalama endeksinin belirlenmesinde birçok farklı yöntem kullanılmıştır. Konsantrasyon değerini baz alan yöntemde, dokuları bütüne yakın olarak parçaladığı bilinen bir yöntemden sonra ekstraksiyonda elde edilen bir metabolit konsantrasyon değerinin ön işlemde elde edilene oranı şeklinde olmaktadır. Bununla birlikte, PEF çalışmalarında elektriksel iletkenlik değişimini baz alan yöntemleri kullanmak daha yaygındır. Bunların bir kısmında, konsantrasyon yönetimine benzer şekilde, dokuları bütüne yakın olarak parçaladığı bilinen bir yöntemden sonra gelişen elektriksel iletkenlik değerinin ön işlemde elde edilene oranı şeklinde belirlenmektedir. Bu yöntem genelde hücre içi elektriksel iletkenliğin hücreler arasındakinden çok daha yüksek olması ve dolayısıyla doku parçalandığında doku iletkenliğinde önemli bir artış göstereceği ilkesine dayanmaktadır. İlâveten bu yöntemin geçerli olabilmesi ölçüm frekansın hücre zarlarında önemli bir geçirgenlik oluşturmayan  $\alpha$ -frekans domeyninde veya tercihen 1-5 kHz olması gerekmektedir. Örneğin, Vorobiev ve Lebovka tarafından kullanılan endeks değeri denklem 1'deki gibi tanımlanmıştır (Fincan, 2015; Vorobiev ve Lebovka, 2020).

$$Z = \sigma - \sigma_i / \sigma_d - \sigma_i \quad (\text{Denklem 1})$$

Burada  $\sigma$ , düşük frekansta (1-5 kHz) ölçülen elektriksel iletkenlik değeridir ve  $i$  ve  $d$  alt simgeleri sırasıyla sağlam ve tamamen parçalanmış (dondurup-çözündürme, mekaniki öğütme veya ısı işlem) dokunun iletkenliklerini belirtir. Bu tanım, sağlam doku için  $Z \approx 0$  ve tamamen parçalanmış doku için  $Z \approx 1$  değerlerini verir.

Parçalanma endeksini elektriksel iletkenlik tahmininde kullanılan diğer bir yöntem, hücre zarlarının düşük ve yüksek ölçüm frekansına karşı

gösterdikleri davranış farkına dayanmaktadır. Buna göre sağlam dokunun iletkenliği düşük  $\alpha$  frekans domeyninde (1-5 kHz) ölçüldüğünde, hücre zarları dielektrik özelliklerini korumakta olduğundan ölçüm interesellüler bölgedeki iyonların bir ölçüsü olmaktadır. Diğer bir deyişle, hücre zarları yalıtkan özelliklerini koruduklarından, intrasellüler bölgedeki iyonlar ölçümde büyük oranda algılanmaktadır. Fakat ölçüm, yerince yüksek  $\beta$  frekans domeyninde (3-50 MHz) yapıldığında, hücre zarları dielektrik özelliklerini yitirdiklerinden (Maxwell-Wagner etkisi), ölçüm intersellüler ve intrasellüler iyonların bir ölçüsü olmaktadır. Diğer bir ifade ile sağlam dokunun iletkenliği bu domeynde yapıldığında, hücre zarları (herhangi bir yolla) bütüne yakın parçalanmış dokunun iletkenliğine yaklaşmaktadır. Buna ilişkin doku parçalanma endeksi, Knorr ve Angersbach (1998), tarafından denklem 2'deki tanımlanıp kullanılmıştır.

$$Z_p = \frac{\left(\frac{\sigma_h^i}{\sigma_h^t}\right)\sigma_l^t - \sigma_l^i}{\sigma_h^i - \sigma_l^i} \quad (\text{Denklem 2})$$

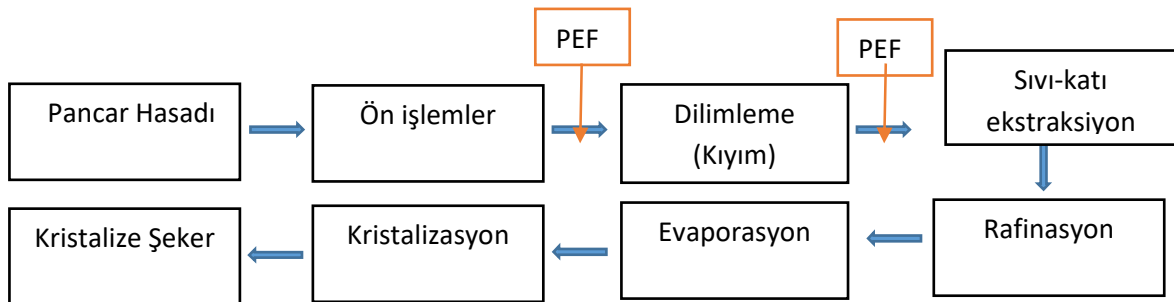
$\sigma_l^t$  ve  $\sigma_l^i$  sırasıyla  $\alpha$  frekans domeyninde (1-5 kHz) işlem görmüş ve işlem görmemiş (sağlam) dokunun  $\sigma_h^t$  ve  $\sigma_h^i$  ise sırasıyla  $\beta$  frekans domeyninde (3-50 MHz) işlem görmüş ve işlem görmemiş dokunun elektriksel iletkenliğidir. Buna göre sağlam doku için  $Z_p \approx 0$ , tam parçalanmış doku için  $Z_p \approx 1$  olmaktadır.

## PEF İN ŞEKER EKSTRAKSİYONUNDA POTANSİYELİ

PEF uygulamasının şeker ekstraksiyonundaki etkileri pek çok bilim insanı tarafından uzun yıllardır araştırılmaktadır. Anatoli Zagorul'ko uzun yıllar yaptığı çalışmalarla (1949-1957) PEF tekniğinin şeker pancarı hücrelerini parçalamada kullanılabileceğini göstermiş ve doktora tezinde yaptığı çalışması ile ilk kez soğuk ve seçici elektrop plazmoliz kavramını geliştirmiştir. 1980'ler ve 1990'ların ortalarında AC ve DC elektrik alanlarının ( $E = 30-100$  V/cm) şeker pancarı dilimlerinin elektrop plazmolizi üzerindeki etkileri araştırılmış ve elektrik destekli işlemler ile yüksek saflıkta şerbet elde edilebileceği gösterilmiş ve ayrıca şeker pancarı dokusunun parçalanma derecesinin elektrik alan kuvveti ve işlem

süresinden etkilendiği bildirilmiştir (Sitzmann, Vorobiev ve Lebovka, 2017). PEF ile şekerce zengin bitkisel dokuların bozundurulması ve şekerin ekstrakte edilebilirliği hakkında çalışmalar 2000'li yıllardan itibaren artarak devam etmiştir. Yapılan çalışmalara bir bütün olarak bakıldığında, PEF in etkisi farklı şekilde ve alanda incelenmiştir. Bir grup çalışma alanında, PEF in elektriksel ve ortam parametreleri değiştirildiğinde, bunun dokunun parçalanma derecesi ve ekstraksiyon verimi üzerine etkilerinin çalışıldığı görülmektedir. Ekstraksiyon verimi incelenirken, tam doku bozunumu veya hücre zarının deformasyon derecesi (gözenek büyüklüğü gibi) ekstraksiyon öncesi belirlenmesi gerekmektedir, bununla beraber, bu unsur belirlenmeden yapılan çalışmalara da rastlanmaktadır (Eshtiaghi ve Knorr, 2002; Lebovka vd., 2007). Ekstraksiyon verimi dışında veya yanında, PEF ve ortam değişkenlerinin sıvı-katı ekstraksiyonda safsızlıklar üzerine etkileri daha az oranda çalışıldığı görülmektedir. Her iki alanda, PEF değişkenlerinin etkisi elektriksel iletkenlik ve sıcaklık gibi ortam parametreleri ile de etkileşmektedir. Buna göre çalışmalar, dokunun bulunduğu ortam ve özelliklerine de göre de farklılıklar göstermektedir. Bir grup çalışmada, tüm pancar dokusu çeşme suyu veya distile su içerisinde iken PEF uygulanıp, akabinde kıyılıp, pul haline getirilmiş dokudan ekstraksiyon ve safsızlıklar incelenmiştir (Schultheiss vd., 2002). Diğer uygulama şeklinde ise, pancar dokuları pul haline getirildikten sonra, su içerisinde uygulama

yapılmıştır. Bu sonrakinde, yüzeyde kesilerek bozulan hücrelerden su içerisine iyon salınımı sonucu ortam elektriksel iletkenliği artmakta buna göre de PEF in etkileri değişiklik göstermektedir. Bunun en önemli etkisi PEF uygulaması esnasında ortaya çıkan sıcaklık artışında olmaktadır, çünkü elektrik alan etkisi altında sürüklenen iyon miktarı arttıkça sürtünmede artmaktadır (Bazhal vd., 2003). Bu tip çalışmalarda, PEF in yanında ortaya çıkan sıcaklık artışı da bozunum düzeyi, ekstraksiyon verimi ve safsızlıklar üzerine etkide bulunmaktadır. PEF ile ısısal olamayan bir sıvı-katı ekstraksiyon amaçlanıp, sağladığı enerji tasarrufu hakkında bir genelleme yapılırsa, ortam ve PEF değişkenlerine bağlı olarak, 10-20 kJ/kg civarında enerji sarf edilmektedir. Bu ısı işlemdekine (175 kJ/kg) kıyas edildiğinde %80-90 aralığında tasarrufa tekabül etmektedir (Schultheiss vd., 2002). Bundan başka, PEF ön işlemi ile şeker ekstraksiyonunu konu edinen çalışmalara bakıldığında, ön işlemin uygulama aşamasında da farklılıklar görülmektedir. Presleme ile ekstraksiyonda, genellikle doku boyutları küçültülüp, su eklendikten sonra presleme gerçekleştirilmektedir (Eshtiaghi ve Knorr, 2002). Sıvı-katı ekstraksiyonda ise PEF ön işlemi ya bütün (dilimlenmemiş) pancara uygulanıp, sonra dilimlenmekte veya dilimlenmiş dokular su içerisine alınıp ön işlem uygulandıktan sonra ekstraksiyona gönderilmektedir (Schultheiss vd., 2002; Rezaee vd., 2019; Nakthong ve Eshtiaghi, 2020).



Şekil 1. Geleneksel yöntemle şeker üretiminde proses akış diyagramı ve çalışmalarda PEF in uygulandığı farklı yerler

Çizelge 1. Farklı çalışmalarda şeker ekstraksiyonunda PEF uygulamasının yapıldığı çalışmaların özeti

| Uygulama  | PEF işlem koşulları  | Etkileri   | Referanslar                     |
|---|--|--|---------------------------------|
| Şeker pancarı dilimlerine (2 cm × 1.2 cm) veya rendelerine PEF uygulama ve presleme                                       | 2.4 kV/cm elektrik alan kuvveti, vurgu sayısı 20, frekans 1 Hz   | 2 veya 5 MPa'da, şekerin bütüne yakın ekstraksiyonu, posada ısıtılma işlemi (~%15) göre daha yüksek kuru madde (~%30) kalıntısı  | (Eshiahi ve Knorr, 2002)        |
| Bütün şeker pancarına (dilimlenmemiş) PEF uygulama sonrası presleme (32 bar, 15 dakika) veya soğuk sıvı-katı ekstraksiyon | 12 kV/cm elektrik alan şiddeti, 1 µs mono polar vurgu, 10 Hz frekans   | PEF ve ısıtılma işlemi ile hücre bozundurmada enerji sarfiyatı 2-10 kJ/kg ve 174 kJ/kg (~%94 enerji tasarrufu), Preslemede benzer verim, (~%3)   | (Schultheiss vd., 2002)         |
| Şeker pancarı dilimlerine (1.2 mm × 2.2 mm, 3-4 cm) PEF uygulama ve soğuk katı sıvı ekstraksiyon                          | 160-780 V/cm elektrik alan şiddeti, 100 µs vurgu genişliği, 10 ms vurgu aralığı, vurgu sayısı 1000   | PEF işleminin ardından çözünen madde miktarının elektriksel iletkenlikle orantılı artışı   | (Jemai ve Vorobiev, 2003)       |
| Şeker pancarı dilimlerine (30 mm × 8.5 mm) PEF uygulama soğuk katı-sıvı ekstraksiyon optimizasyonu                        | 940 V/cm elektrik alan şiddeti, vurgu sayısı 250, spesifik enerji girişi 6-7 kJ/kg   | Optimal PEF parametreleri 940 V/cm elektrik alan şiddeti, 250 vurgu spesifik enerji girişi 6-7 kJ/kg   | (El Belghiti ve Vorobiev, 2004) |
| Şeker pancarı dilimlerine (6 mm × 1.5 mm) farklı koşullarda PEF uygulama ve farklı sıcaklıklarında ekstraksiyon           | 300-800 V/cm elektrik alan şiddeti, kare mono polar vurgular, vurgu sayısı 50-1000 aralığında, vurgu süresi 100 µs, frekans 1000 Hz  | PEF işlemi ile ısıtılma işleminden daha az renkli ve daha yüksek saflıkta şerbet eldesi (PEF %94, termal işlem %89)<br>PEF ön işlemiyle oda sıcaklığında 70 dakika elde edilen verimin 50 °C'de 40 dakika da elde edilmesiyle ekstraksiyon süresinde ~ %45 düşüş | (El-Belghiti vd., 2005)         |
| Şeker pancarı dilimlerine (1.5 mm × 10 mm × 10 mm) PEF uygulama ve 20-70 °C sıcaklık aralığında ekstraksiyon              | 100- 400 V/cm elektrik alan şiddeti aralığında, toplam işlem süresi 0.1 s., vurgu sayısı 4, vurgu süresi 9.9 ms, vurgu aralığı 10 ms, bipolar kare vurgu                                     | 40 °C ekstraksiyonda PEF ile şerbet brix değerinde ~ 2 kat artış, 80 °C'de ise benzer brix değeri, 20 °C PEF li örnek ile 70 °C işlem görmemiş örnek arasında şerbet saflığında yaklaşık ~ 5 birimlik fark (%96- %91)  | (Lebovka vd., 2007)             |
| Şeker pancarı dilimlerine (1 cm × 2.5 cm) PEF uygulama  | Kare eksponansiyel vurgular, 1-7 kV/cm elektrik alan şiddeti, 5-40 vurgu sayısı spesifik enerji girişi 0.006-0.19 kJ/kg, 1-10 Hz frekans aralığı, vurgu genişliği 2-5 µs, sıcaklık 20°-70 °C | Sükroz verimi, frekanstan, vurgu genişliğinden ve vurgu şeklinden bağımsız, elektrik alan kuvvetinden ve ekstraksiyon ortamının sıcaklığına bağımlı, PEF uygulamasıyla (7 kV/cm-20 vurgu) 20° ve 40 °C'de ekstraksiyonlarda sırasıyla 7 ve 1.6 kat verim artışı  | (López vd., 2009)               |



Çizelge 1. devam

| Uygulama  | PEF işlem koşulları   | Etkileri  | Referanslar                   |
|---|---|---|-------------------------------|
| Şeker pancarı dilimlerine PEF uygulama sonrası değişen (30°-70 °C) sıcaklıklarda ekstraksiyon ve 6 bar da presleme                | 100-600 V/cm elektrik alan şiddeti, toplam uygulama süresi 50 ms. Vurgu sayısı 500, vurgu süresi 100 µs, vurgular arası süre 5 ms, Sıcaklık 30°-70 °C | 30 °C'de ekstraksiyonda PEF li örneklerden yaklaşık 2 kat daha fazla sükröz eldesi, PEF uygulamasının ~ 10 kat daha düşük enerji tüketimi, ısıl işleme göre ~ 2 kat daha kuru posa eldesi                     | (Loginova vd., 2011)          |
| Şeker pancarı dilimlerine (4-9 cm × 3 mm) PEF uygulaması ve 30° ve 50 °C'de katı sıvı ekstraksiyon                                | 600 V/cm elektrik alan şiddeti, vurgu sayısı 500, vurgu süresi 100 µs, frekans 200 Hz   | Klasik ekstraksiyon ile benzer brix değeri, PEF ile yaklaşık 14 kat düşük pektin içeriğine sahip şerbet eldesi, sıcaklığın 70 °C çıkmasıyla bulanıklıkta ~ %10 ve şerbet renklenmesinde ~ %27 artış           | (Loginova vd., 2011)          |
| Şeker pancarı dilimlerine PEF uygulama ve ekstraksiyon, farklı konsantrasyonlarda kireç kullanarak saflaştırma                    | 600 V/cm elektrik alan şiddeti, toplam işlem süresi 50 ms   | 70 °C sıcak ekstraksiyonda (15 kg/m <sup>3</sup> ) PEF li örneklere (8 kg/m <sup>3</sup> ) kıyasla ham şerbetin saflaştırılması için ~ 2 kat fazla CaO ihtiyacı   | (Loginova vd., 2012)          |
| Şeker pancarı dilimlerine (1 cm × 3 cm) PEF uygulama ve soğuk katı-sıvı ekstraksiyon  | 0.5-6 kV/cm elektrik alan şiddeti 0.5, 0.8, 32 µF; vurgu sayısı 1-100; frekans 1Hz.   | PEF ve ısıl işlem (80 °C 10 dk) ile hücre bozundurmada enerji sarfiyatı 8 kJ/kg ve 156 kJ/ kg (~ 20 kat tasarruf)   | (Maskooki ve Eshtiaghi, 2012) |
| 1 kg şeker pancarı dilimlerine PEF uygulama sonrası 5 bar da presleme ve 30°-70 °C'de sıvı-katı ekstraksiyon                      | 600 V/cm elektrik alan şiddeti, toplam işlem süresi 5 ms, vurgu süresi 100 µs, vurgu genişliği 10 ms, Spesifik enerji girişi 2.76 ± 0.16 W h/kg       | Sıvı-katı ekstraksiyon sonunda PEF li örneklerin şerbetinde ısıl işleminkinden daha fazla şeker oranı (~%1,1) posada kalan sakkaroz miktarında ~ %33 düşüş (%1.2 -%0.8)                                       | (Mhemdi vd., 2016)            |
| Şeker pancarı dilimlerine (1 cm × 3.5 cm) farklı koşullarda PEF uygulaması  | 0.5, 0.75 ve 1.5 kV/cm elektrik alan şiddeti, üstel azalan mono polar vurgular (10-20-30), vurgu süresi 10 µs   | Membran hasarının artan elektrik alan şiddeti ve darbe sayısına bağlılığı ve PEF sonrası dokuda yumuşama  | (Rezaee vd., 2019)            |
| Şeker pancarı dilimlerine (5-6 mm × 50-80 cm) PEF uygulama ve 35-50 °C'de sıvı-katı ekstraksiyon sonrası presleme ve posa kurutma | 0.9 kV/cm elektrik alan şiddeti, 10 Hz, vurgu süresi 0.5 ms, spesifik enerji girişi 10 kJ/kg  | 50 °C'de ekstraksiyon sonrası PEF li örneklere kıyasla pres suyu brix değerinde ~ 4 kat düşüş, 30 ve 70 dk sıvı-katı ekstraksiyon sonunda PEF li örneklerde ısıl işlemden daha yüksek verim (~ 6 birim artış) | (Nakthong ve Eshtiaghi, 2020) |

Eshtiaghi ve Knorr (2002) şeker pancarlarının PEF ile bozunumunu elektriksel iletkenlik bazlı bir parçalanma edeksi ( $Z_p$ ) ile değerlendirip, sonrasında PEF in preslemedeki etkilerini farklı örnek iriliklerinde , kuru madde, sakkoroz ve ekstraksiyon verimi açısından incelemiştir. 2.4 kV/cm ve 3.5  $\mu$ F 20 vurgu sayısında  $Z_p \approx 0.5$  iken 100 vurguda 0.65 yükseldiği ancak, 200 vurgudan sonra önemli bir artış olmadığını bildirmiştir. 2.4 kV/cm da 20 vurguluk uygulama ve 2 veya 5 MPa presleme sonrası, şekerin %100 yakın oranda ekstrakte olduğunu, ve posanın ısı işlemi artı preslemeden yaklaşık %50 oranında daha fazla kuru madde içerdiğini rapor etmiş ve PEF ön işleminin ısı işleme göre enerji tasarruflu bir uygulama olduğunu belirtmiştir.

Schultheiss vd. (2002) endüstriyel ölçekli PEF uygulaması tasarlayarak, tüm (dilimlenmemiş) şeker pancarına 12 kV/cm elektrik alan kuvvetinde 1 $\mu$ s lik monopolar vurguları 10 Hz frekans da uygulamış, sonrasında dokuları küçük parçalar halinde kesip presde ( 32 bar, 15 dakika) pancar suyu/şerbet verimini veya soğuk sıvı-katı ekstraksiyonunda (şerbette ve küspede ) sakkaroz oranını incelemiştir PEF ön işlemleri ve ısı ön işlemleri (72 °C) benzer oranda (preste) pancar suyu verimi verirken PEF (2-10 kJ/kg) işleminin enerji sarfiyatı (174 kJ/kg), ısı işleme göre önemli derecede düşük bulunmuştur. Sıvı-katı ekstraksiyonda şerbette sakkoroz verimi PEF işlemleri örneklerde ısı işlemleri örneklerden ortalamada ~%3 daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

Vorobiev (2003) Pancar dilimlerini 50 dakika su içerisinde tuttuktan sonra, PEF uyguladığında, çözünen madde miktarının ve elektriksel iletkenlikle beraber anlık olarak arttığını göstermiş, elektriksel iletkenliğin ekstraksiyon derecesini göstermede kullanılabileceğine işaret etmiştir.

El Belghiti ve Vorobiev (2004) silindirik şeker pancarı dilimlerine farklı elektrik alan şiddetlerinde ve vurgu sayılarında PEF işlemleri uygulamış ve sıvı-katı ekstraksiyon optimizasyonu yapılmıştır. 940 V/cm elektrik alan şiddetinde vurgu sayısının 250 üzerine çıkmasının verimde

herhangi bir artışa neden olmadığı, karıştırma işleminin ekstraksiyon için önemli bir parametre olduğu sonucuna varılmıştır. PEF ile şeker pancarından şeker ekstraksiyonu için hedeflenen minimum enerji tüketimiyle maksimum verim için şartların; 940 V/cm elektrik alan şiddeti, 250 vurgu, 250 rpm karıştırma hızı ve spesifik enerji girişinin kg şeker pancarı başına 6-7 kJ olduğu rapor edilmiştir.

El-Belghiti vd. (2005) farklı PEF koşulları ve ekstraksiyon sıcaklıkları altında şeker pancarı dokusundan şeker ekstraksiyonunun kinetiğini incelemiş ve PEF işleminin sonra ham şerbet saflığı termal işleme karşılaştırılmıştır. 670 V/cm elektrik alan kuvveti ve 250 vurgu sayısında ekstraksiyon veriminin maksimum olduğunu rapor, oda sıcaklığında 70 dakika elde edilen verimin 50 °C'de 40 dakika da elde edildiği görülmüş ve orta dereceli sıcaklıklarla PEF işleminin kombine edilmesinin yararlı olacağı sonucuna varılmıştır. Ayrıca PEF işleminin ısı işlemden daha az renkli ve daha yüksek saflıkta şerbet verdiğini rapor etmiştir (PEF %94, termal işlem %89).

Lebovka vd. (2007) farklı PEF koşullarının ve ekstraksiyon sıcaklıklarının etkisinin karşılaştırıldığı çalışmada 100 V/cm elektrik alan kuvvet; şeker pancarı hücrelerinin verimli bir şekilde parçalanması sağlanmış ve 40 °C ekstraksiyonda işlem görmemiş örneklerden yaklaşık 2 kat daha fazla brix değerine sahip şerbet elde edildiği ve 80 °C'de ekstraksiyonda örneklerin brix değerleri arasında bir fark gözlemlenemediği rapor edilmiştir. Ayrıca 20 °C'de PEF uygulaması ile 70 °C'de işlem görmemiş örneklerin şerbet saflığında yaklaşık 5 birimlik fark (~%96 - ~%91) olduğu bildirilmiştir.

Lopez vd. (2009) farklı PEF koşulları ve ekstraksiyon sıcaklıkları altında şeker pancarı dokusundan şeker ekstraksiyonunun kinetiğini incelemiş ve PEF parametrelerinin şeker ekstraksiyon kinetiğine etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre; sıvı-katı ekstraksiyonun verimi, frekanstan, vurgu genişliğinden ve vurgu şeklinden bağımsız iken uygulanan elektrik alan kuvvetine ve ekstraksiyon ortamının sıcaklığına

bağımlı olduğu bildirilmiştir. 7 kV/cm'de (3.9 kJ/kg) 20 atımın uygulanması, PEF işlemi uygulanmamış örneklerle kıyasla sırasıyla 20° ve 40 °C'de yaklaşık 7 ve 1.6 kat verimi arttırdığı rapor edilmiştir.

Loginova vd. (2011) endüstriyel ölçekli tesis tasarlayarak PEF uygulamasının ve sıcaklığın şeker ekstraksiyonu, şerbet ve posa kalitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, 30-70 °C aralığındaki sıcaklıklarda ekstraksiyon ve posaya 6 bar'da 30 dakika presleme yapılmıştır. Sonuçta, 30 °C'deki ekstraksiyonda PEF uygulamasıyla elde edilen sükröz içeriğinin yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu (%13 - %6), PEF li örneklerden presleme sonrası yaklaşık 2 kat daha kuru posa eldesi ve ekstraksiyon süresinin 70 °C'den 30 °C'ye düşürülmesiyle yaklaşık 46.7 kW.h/t enerji tasarrufu sağlanabileceği fakat PEF işleminin (5.4 kW.h/t ) yaklaşık 10 kat düşük enerjiye ihtiyaç duyduğu rapor edilmiştir.

Loginova vd. (2011) PEF destekli "soğuk" (30 °C), hafif termal (50 °C) sıvı-katı ekstraksiyonundan elde edilen şerbetlerin; çözünür katı konsantrasyonu, saflık, renklenme ve filtre edilebilirlik gibi parametreleri termal sıvı-katı ekstraksiyon (70 °C) ile karşılaştırılmıştır 500 g şeker pancarı dilimlerine, 600 V/cm elektrik alan şiddeti, vurgu sayısı 500, vurgu süresi 100 µs, frekans 200 Hz, PEF işlemi uygulanmış, 30 °C ve 50 °C'de ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar klasik sıvı-katı ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında; %brix değerinde benzer sonuçlar, PEF uygulamasıyla elde edilen şerbetlerin daha saf ve pektin içeriğinin yaklaşık 14 kat daha düşük olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ekstraksiyon sıcaklığının 30 °C'den 70 °C'ye yükselmesiyle şerbet bulanıklığının yaklaşık %10 ve şerbet renklenmesinin yaklaşık %27 arttığı rapor edilmiştir.

Loginova vd. (2012) önceki çalışma şartlarına göre (Loginova vd., 2011) PEF işlemi uygulanmış ve 30 °C'de sıvı-katı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş sonrasında kireç-karbondioksit işlemi uygulanmış ve sonuçları 70 °C sıvı-katı ekstraksiyon ile karşılaştırılmıştır. 30 °C'de ekstrakte edilen ham şerbetin saflaştırılmasının, ilk karbonatlamada

daha hızlı süzülmesi ve elde edilen son şerbetin daha az renkli olduğu görülmüş ayrıca verimli ham şerbet saflaştırması için gerekli olan CaO miktarının 70 °C geleneksel ekstraksiyon da (15 kg/m<sup>3</sup>) 30 °C'de PEF destekli ekstraksiyona (8 kg/m<sup>3</sup>) kıyasla yaklaşık 2 kat fazla olduğu bildirilmiştir.

Maskooki ve Eshtiaghi (2012) şeker pancarı şeker ekstraksiyonunda optimum PEF koşullarını belirlemek için yaptıkları çalışmada; şeker pancarı dilimlerine 0,5–6 kV/cm elektrik alan kuvvetinde, vurgu sayısı 1–100 aralığında olacak şekilde PEF işlemi uygulanmıştır. Şeker pancarındaki doku hasarının en çok toplam enerji girdisi ve elektrik alan kuvvetinden etkilendiği ve maksimum bozunum için 60 vurgu sayısından sonrasının belirgin bir etki göstermediği rapor edilmiştir. PEF ön işlemi uygulanmış şeker pancarından (1 veya 2 kV/cm) oda sıcaklığında katıların transferi, 75 °C'de işlem görmemiş örneklerden daha yüksek olduğu ve 10 dakika boyunca 80 °C'ye kadar yüksek sıcaklıkta ısıl işlem şeker pancarı hücrelerini tamamen parçalamasına rağmen, enerji tüketiminin PEF işleminden yaklaşık 20 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir.

Mhemdi vd. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada, PEF destekli yeni bir proses tasarlanmış ve difüzyon parametreleri, ham şerbetin kalitatif özellikleri ve posa üzerindeki etkileri termal sıvı-katı ekstraksiyon işleminin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Rendelenmiş şeker pancarları; ortam sıcaklığında mono polar, 600 V/cm elektrik alan şiddeti, uygulama süresi 5ms, vurgu süresi 100µs, vurgu genişliği 10ms olacak şekilde PEF ile ön işleme tabi tutulmuş, sonra preslenmiş (4 dakika), kalan sakarozu ekstrakte etmek için preslenmiş dilimler sürekli bir pilot difüzöre (10 kg/sa) iletilmiştir. Yeni proses ile elde edilen ham şerbetin daha berrak (%92.8 - %91.8), daha konsantre (16.2 °Bx -14.6 °Bx ) ve posada kalan sakaroz miktarının daha düşük ( %1.2- %0.8) ve sistemin geleneksel yöntemle kıyasla daha az enerji tükettiği rapor edilmiştir.

Rezaee vd. (2019) PEF uygulamasının şeker pancarı dokusunun viskoelastik özelliklerine etkisini inceledikleri çalışmada; şeker pancarı

dilimlerine 0.5, 0.75 ve 1.5 kV/cm elektrik alan şiddeti, üstel azalan mono polar vurgular (10-20-30), vurgu süresi 10 µs PEF işlemi uygulanmış ve dokuda PEF kaynaklı etkilerin artan alan gücü ve darbe sayısından etkilendiği, hücre parçalanma indeksinin ( $Z_p$ ) artmasıyla elastik modülde ve gevşeme sürelerinde azalma olduğu ve bu sonuçlarında şeker pancarı dokusunda sadece hücre membranının değil hücre duvarının da PEF uygulamasından etkilendiği bildirilmiştir. Nakthong ve Eshtiaghi (2020) sürekli pilot ölçekli şeker ekstraksiyonu üzerine PEF etkisinin araştırıldığı çalışmada; şeker pancarı dilimlerine, 0.9 kV/cm elektrik alan şiddeti, 10 Hz frekansta, vurgu süresi 0.5 ms, spesifik enerji girişi 10 kJ/kg şartlarında PEF işlemi uygulanmış ve sonrasında 35 ° ve 50 °C'deki sonuçlar 70 °C'de sıvı-katı ekstraksiyon ile karşılaştırılmıştır. PEF ile ön işleme tabi tutulmuş örneklerin şeker ekstraksiyon verimi işlem görmemiş örneklerden yaklaşık 6 birim daha fazla olduğu ve düşük enerji sarfıyatı (yaklaşık 10 kJ/kg) rapor edilmiştir.

#### SONUÇLAR

Yapılan çalışmaların sonuçları, PEF uygulamasının şeker endüstrisinde kullanımının önemli avantajlar sağlayabileceğini göstermektedir. Bu avantajlar arasında, özellikle PEF in doku bozundurmada, ısıl işleme göre %80-90 oranında enerji tasarrufu sağlaması ve safsızlıkları azaltarak daha az kimyasal kullanımına elvermesi öne çıkmaktadır. Bu açıdan, geleneksel şeker üretim proses zincirinde, PEF in etkide bulunabileceği prosesler ekstraksiyon ve rafinasyon prosesleri olmaktadır. Bununla birlikte, şu ana değin yapılan çalışmaların çoğu laboratuvar ölçeklidir ve yöntemin endüstride kullanılabilmesi için, daha fazla pilot ve endüstriyel ölçekli, yatırım maliyet analizini de içeren çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

#### YAZAR KATKILARI

Makalenin derlenmesinde, yazılmasında ve yayınlanmasında tüm yazarlar katkı sağlamışlardır.

#### KAYNAKLAR

- Astráin-Redín, L., Moya, J., Alejandre, M., Beitia, E., Raso, J., Calvo, B., Cebrian, G., Álvarez, I. (2022). Improving the microbial inactivation uniformity of pulsed electric field ohmic heating treatments of solid products. *LWT - Food Science and Technology*, 154, 112709. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112709>
- Bagade, S. B., Patil, M. (2021). Recent advances in microwave assisted extraction of bioactive compounds from complex herbal samples: *Critical Reviews In Analytical Chemistry*, 51(2), 138-149. [10.1080/10408347.2019.1686966](https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1686966)
- Barros, M., Redondo, L., Rego, D., Serra, C., Miloudi, K. (2022). Extraction of Essential Oils from Plants by Hydrodistillation with Pulsed Electric Fields (PEF) Pre-Treatment. *Applied Sciences*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/app12168107>
- Bazhal, M., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2003). Optimisation of Pulsed Electric Field Strength for Electroporation of Vegetable Tissues. *Biosystems Engineering*, 86(3), 339-345. [https://doi.org/10.1016/S1537-5110\(03\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S1537-5110(03)00139-9)
- Bhattacharjee, C., Saxena, V. K., Dutta, S. (2019). Novel thermal and non-thermal processing of watermelon juice. *Trends in Food Science & Technology*, 93(2019), 234-243. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.09.015>
- Bliesener, K.M., Miehe, D., Buchholz, K. (1991a). Process development in the dewatering of cossettes. *Zuckerindustrie*, 116 (11), 978-986.
- Bocker R., Eric Keven Silva E.K. (2022). Pulsed electric field assisted extraction of natural food pigments and colorings from plant matrices, *Food Chemistry: X*, 15, 100398. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100398>
- Chaves, J. O., De Souza, M. C., Da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C., Machado, Carneiro T. F., Espinosa, M.V., Peredo A.V.G., Barbero G.F., Rostagno, M. A. (2020). Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Frontiers in Chemistry*, 8, 507887. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.507887>

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., AbertVian, M., (2017). Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Dastangoo, S., Hamed Mosavian, M. T., Yeganehzad, S. (2020). Optimization of pulsed electric field conditions for sugar extraction from carrots. *Food Science & Nutrition*, 8(4), 2025-2034. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1490>
- Deng, L. Z., Mujumdar, A. S., Zhang, Q., Yang, X. H., Wang, J., Zheng, Z. A., Gao, Z.J., Xiao, H. W. (2019). Chemical and physical pretreatments of fruits and vegetables: Effects on drying characteristics and quality attributes. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 59(9), 1408-1432. doi: 10.1080/10408398.2017.1409192
- Duan, H., Yan, X., Azarakhsh, N., Huang, X., Wang, C. (2022). Effects of high-pressure pretreatment on acid extraction of pectin from pomelo peel. *International Journal of Food Science and Technology*, 57(8), 5239-5249. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15840>
- Einarsdóttir, R., Þórarinsdóttir, K.A., Aðalbjörnsson, B.V., Guðmundsson M., Marteinsdóttir, G., Kristbergsson K. (2022). Extraction of bioactive compounds from *Alaria esculenta* with pulsed electric field. *Journal of Applied Phycology*, 34, 597-608. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02624-8>
- El Belghiti, K., Vorobiev, E. (2004). Mass transfer of sugar from beets enhanced by pulsed electric field. *Food and Bioproducts Processing*, 82(3C), 226-230. <https://doi.org/10.1205/fbio.82.3.226.44187>
- El-Belghiti, K., Rabhi, Z., Vorobiev, E. (2005). Kinetic model of sugar diffusion from sugar beet tissue treated by pulsed electric field. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 213-218. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1944>
- Eshtiaghi, M. N., Knorr, D. (2002). High electric field pulse pretreatment: Potential for sugar beet processing. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 265-272. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00114-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00114-5)
- Fincan, M. (2015). Extractability of phenolics from spearmint treated with pulsed electric field. *Journal of Food Engineering*, 162(2015), 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.004>
- Fincan, M., DeVito, F., Dejmek, P. (2004). Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 381-388. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2003.11.006>
- Fu, X., Zhao, Z., Yu, S., Chen, W., Wang, J. (2013). The ultrasonic-assisted extraction of sugar from sugar beet cossettes. *International Sugar Journal*, 115(1378), 692-696.
- Gabrić, D., Barba, F., Roohinejad, S., Gharibzahedi, S. M. T., Radojčin, M., Putnik, P., Bursać Kovačević, D. (2018). Pulsed electric fields as an alternative to thermal processing for preservation of nutritive and physicochemical properties of beverages: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 41(1), <https://doi.org/10.1111/jfpe.12638>
- Genovese, J., Kranjc, M., Serša, I., Petracci, M., Rocculi, P., Miklavčič, D., & Mahnič-Kalamiza, S. (2021). PEF-treated plant and animal tissues: Insights by approaching with different electroporation assessment methods. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 74, 102872. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102872>
- Ghosh, D., Saluja, N., Singh, T. G. (2019). A critical analysis of electroporation in medical technology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(1), 23-28. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(1\).23-28](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(1).23-28)
- Giteru, S. G., Oey, I., Ali, M. A. (2018). Feasibility of using pulsed electric fields to modify biomacromolecules: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 91-113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.009>
- Guionet, A., Fujiwara, T., Sato, H., Takahashi, K., Takaki, K., Matsui, M., Tanino, T., Ohshima T. (2021). Pulsed electric fields act on tryptophan to inactivate  $\alpha$ -amylase, *Journal of Electrostatics*, 112,

103597. <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2021.103597>
- Jemai, A. B., Vorobiev, E. (2003). Enhanced leaching from sugar beet cossettes by pulsed electric field. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 405–412. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00499-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00499-5)
- Jiang, Y., Xing, M., Kang, Q., Sun, J., Zeng, X. A., Gao, W., Li H., Gao, Y., Li, A. (2022). Pulse electric field assisted process for extraction of Jiuzao glutelin extract and its physicochemical properties and biological activities investigation. *Food Chemistry*, 383, 132304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132304>
- Kantala, C., Supasin, S., Intra, P., Rattanadecho, P. (2022) Evaluation of Pulsed Electric Field and Conventional Thermal Processing for Microbial Inactivation in Thai Orange Juice. *Foods*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/foods11081102>
- Khan, M. I. H., Nagy, S. A., Karim, M. A. (2018). Transport of cellular water during drying: An understanding of cell rupturing mechanism in apple tissue. *Food Research International*, 105, 772–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.010>
- Knorr, D., Angersbach, A. (1998). Impact of high-intensity electrical field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends Food Science and Technology*, 9, 185–191. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00040-5)
- Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M. V., El-Belghiti, K., Benjelloun, H., & Vorobiev, E. (2007). Plasmolysis of sugarbeet: Pulsed electric fields and thermal treatment. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 639–644. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.06.020>
- Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M. and Abbaspourrad, A. (2020), Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. *Journal of Food Science*, 85, 727-735. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14842>
- Limsangouan, N., Charunuch, C., Sastry, S. K., Srichamnong, W., Jittanit, W. (2020). High pressure processing of tamarind (*Tamarindus indica*) seed for xyloglucan extraction. *LWT - Food Science and Technology*, 134, 110112. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110112>
- Loginova, K. V., Vorobiev, E., Bals, O., Lebovka, N. I. (2011). Pilot study of countercurrent cold and mild heat extraction of sugar from sugar beets, assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 102(4), 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.09.010>
- Loginova, K., Loginov, M., Vorobiev, E., Lebovka, N. I. (2011). Quality and filtration characteristics of sugar beet juice obtained by “cold” extraction assisted by pulsed electric field. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.04.017>
- Loginova, K., Loginov, M., Vorobiev, E., Lebovka, N. I. (2012). Better lime purification of sugar beet juice obtained by low temperature aqueous extraction assisted by pulsed electric field. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 371–374. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.005>
- López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., Ignacio, Á. (2009). Enhancement of the solid-liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), 1674–1680. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.015>
- Mahn, A., Comett, R., Segura-Ponce, L. A., Díaz-Álvarez, R. E. (2022). Effect of pulsed electric field-assisted extraction on recovery of sulforaphane from broccoli florets. *Journal of Food Process Engineering*, 45(7). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13837>
- Manzoor, M. F., Zeng, X. A., Ahmad, N., Ahmed, Z., Rehman, A., Aadil, R. M., Roobab, U., Siddique, R., Rahaman, A. (2020). Effect of

- pulsed electric field and thermal treatments on the bioactive compounds, enzymes, microbial, and physical stability of almond milk during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(7). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14541>
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., Brnčić, S. R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound, microwaves, and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 28-37, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.022>
- Martínez, JM, Delso, C, Álvarez, I, Raso, J. (2020). Pulsed Electric Field-assisted extraction of valuable compounds from microorganisms. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 19, 530–552, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12512>
- Maskooki, A., Eshtiaghi, M. N. (2012). Impact of pulsed electric field on cell disintegration and mass transfer in sugar beet. *Food and Bioprocess Processing*, 90(3), 377–384. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.12.007>
- Mhemdi, H., Bals, O., Vorobiev, E. (2016). Combined pressing-diffusion technology for sugar beets pretreated by pulsed electric field. *Journal of Food Engineering*, 168, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.034>
- Mirzadeh, M., Arianejad, M. R., Khedmat, L. (2020). Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: A review. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115421. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115421>
- Mman R., Kanwal, R., Shafique, B., Arshad, R.N., Irfan, S., Kieliszek, M., Kowalczewski, P.L., Irfan, M., Khalid, M.Z., Roobab, U., Aadil, R.M. (2021). A Critical Review on Pulsed Electric Field: A Novel Technology for the Extraction of Phytoconstituents. *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164893>
- Muir, B.M., Srivastava, S., Mall, A.K (2022). *Sugar Beet Cultivation, Management and Processing In*. Misra, V. (chief ed.), Springer, Singapore. pp. 837–862, ISBN: 978-981-19-2730-0
- Nakthong, N., Eshtiaghi, M. N. (2020). Pulsed electric field treatment of sugar beet. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 505(1), 012055. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/505/1/012055>
- Niu, D., Zeng, X. A., Ren, E. F., Xu, F. Y., Li, J., Wang, M. S., Wang, R. (2020). Review of the application of pulsed electric fields (PEF) technology for food processing in China. *Food Research International*, 137, 109715, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109715>
- Nowacka, M., Tappi, S., Wiktor, A., Rybak, K., Miszczykowska, A., Czyzewski, J., Drozdal, K., Witrowa-Rajchert, D., Tylewicz, U. (2019). The Impact of Pulsed Electric Field on the Extraction of Bioactive Compounds from Beetroot. *Foods*. 8(7),244. <https://doi.org/10.3390/foods8070244>
- Oroian, M., Dranca, F. Ursachi, F. (2020). Comparative evaluation of maceration, microwave and ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from propolis. *Journal of Food Science Technology*, 57, 70–78. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04031-x>
- Ponant, J., Foissac, S., Esnault, A. (1988). The alkaline extraction of sugar beet. *Zuckerindustrie*, 113(8), 665-676.
- Putnik, P., Kresoja, Ž., Bosiljkov, T., Jambrak, A. R., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Roohinejad S., Granato, D., Žuntar, I., Kovačević, D. B. (2019). Comparing the effects of thermal and non-thermal technologies on pomegranate juice quality: *Food Chemistry*, 279, 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.131>
- Rahaman, A., Siddeeg, A., Manzoor, M.F. (2019) Impact of pulsed electric field treatment on drying kinetics, mass transfer, colour parameters and microstructure of plum. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2670–2678. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03755-0>
- Rezaee, K., Noghabi, M. S., Behzad, K., Maskooki, A. (2019). Effect of moderate pulsed electric field treatment on viscoelastic properties of sugar beet. *Food Science and Technology Research*, 25(2), 157–166. <https://doi.org/10.3136/fstr.25.157>

- Ricci, A., Parpinello, G.P., Versari, A. (2018) Recent Advances and Applications of Pulsed Electric Fields (PEF) to Improve Polyphenol Extraction and Color Release during Red Winemaking. *Beverages*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/beverages4010018>
- Rodriguez Garcia, S. L., Raghavan, V. (2022). Green extraction techniques from fruit and vegetable waste to obtain bioactive compounds, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(23), 6446-6466. doi:10.1080/10408398.2021.1901651
- Roobab, U., Abida, A., Chacha, J.S., Athar, A., Madni, G.M., Ranjha MMAN., Rusu A.V., Zeng, X-A., Aadil, R.M., Trif, M. (2022). Applications of Innovative Non-Thermal Pulsed Electric Field Technology in Developing Safer and Healthier Fruit Juices. *Molecules*, 27(13). <https://doi.org/10.3390/molecules27134031>
- Ruzgys, P., Jakutavičiūtė, M., Šatkauskienė, I., Čepurnienė, K., Šatkauskas, S. (2019). Effect of electroporation medium conductivity on exogenous molecule transfer to cells in vitro. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9. doi:10.1038/s41598-018-38287-8
- Šalaševičius, A., Uždavinytė, D., Visockis, M., Ruzgys, P., Šatkauskas, S. (2021). Effect of Pulsed Electric Field (PEF) on Bacterial Viability and Whey Protein in the Processing of Raw Milk. *Applied Sciences*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/app112311281>
- Samaranayake, C. P., Mok, J. H., Heskitt, B. F., Sastry, S. K. (2022). Nonthermal inactivation of polyphenol oxidase in apple juice influenced by moderate electric fields: Effects of periodic on-off and constant exposure electrical treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 77, 102955. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.102955>
- Schultheiss, C., Bluhm, H., Mayer, H. G., Kern, M., Michelberger, T., Witte, G. (2002). Processing of sugar beets with pulsed-electric fields. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30(4I), 1547-1551. <https://doi.org/10.1109/TPS.2002.804212>
- Semenoglou, I., Dimopoulos, G., Tsironi, T., Taoukis, P. (2020). Mathematical modelling of the effect of solution concentration and the combined application of pulsed electric fields on mass transfer during osmotic dehydration of sea bass fillets. *Food and Bioprocess Processing*, 121, 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.02.007>
- Shiekh, K. A., Olatunde, O. O., Zhang, B., Huda, N., Benjakul, S. (2021). Pulsed electric field assisted process for extraction of bioactive compounds from custard apple (*Annona squamosa*) leaves. *Food Chemistry*, 359, 129976. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129976>
- Shorstkii, I., Comiotto Alles, M., Parniakov, O., Smetana, S., Aganovic, K., Sosnin, M., Toepfl S., Heinz, V. (2022). Optimization of pulsed electric field assisted drying process of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Drying Technology*, 40(3), 595-603. doi:10.1080/07373937.2020.1819825
- Sitzmann, W., Vorobiev, E., Lebovka, N. (2017). Handbook of Electroporation In: *Pulsed Electric Fields for Food Industry*, Miklavčič, D. (chief ed.), Springer International Publishing Cham, Switzerland, pp. 2335-2354.
- Soltanzadeh, M., Peighambaroust, S. H., Gullon, P., Hesari, J., Gullón, B., Alirezalu, K., Lorenzo, J. (2020). Quality aspects and safety of pulsed electric field (PEF) processing on dairy products: *Food Reviews International*, 38(2022), 96-117. doi:10.1080/87559129.2020.1849273
- Stanley, D. (1991). Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(5), 487-593. <https://doi.org/10.1080/10408399109527554>
- Şengül, M., Topdaş, E. F. (2019). Katı-Sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Modern Teknikler ve Bu Teknikler Arasında Ultrason Yardımlı Ekstraksiyonun Yeri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50(2), 201-216. doi:10.17097/ataunizfd.466649
- Timmermans, R. A., Roland, W. S., van Kekem, K., Matser, A. M., van Boekel, M. A. (2022). Effect of Pasteurization by Moderate Intensity Pulsed Electric Fields (PEF) Treatment Compared to Thermal Treatment on Quality



- Attributes of Fresh Orange Juice. *Foods*, 11(21). <https://doi.org/10.3390/foods11213360>
- Tylewicz U., (2020). Pulsed Electric Fields to Obtain Healthier and Sustainable Food for Tomorrow. In: *How does pulsed electric field work ?* Barba, F. J., Parniakov, O., Wiktor, A. ( Eds.), Academic Press, the UK, pp. 3-21.
- Visockis, M., Bobinaitė, R., Ruzgys, P., Barakauskas, J., Markevičius, V., Viškelis, P., Šatkauskas, S. (2021). Assessment of plant tissue disintegration degree and its related implications in the pulsed electric field (PEF)–assisted aqueous extraction of betalains from the fresh red beetroot. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 73, 102761. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102761>
- Vorobiev E., Lebovka N., (2019). Green Food Processing Techniques In: *Pulsed electric field in green processing and preservation of food products*, Chemat F., Vorobiev E. (Eds.), Academic Press, the UK, pp. 403-430.
- Vorobiev, E., Lebovka, N. (2020). *Processing of Foods and Biomass Feedstocks by Pulsed Electric Energy*. 1st Edition, Springer Cham, Switzerland, 418 p.
- Vorobiev, E., Lebovka, N.I. (2022). Pulsed Electric Fields Technology for the Food Industry. In: *Cell Membrane Permeabilization by Pulsed Electric Fields for Efficient Extraction of Intercellular Components from Foods*, Raso, J., Heinz, V., Alvarez, I., Toepfl, S. (Eds.), Volume 2, Springer International Publishing, Switzerland pp. 209-269.
- Vu, T., LeBlanc, J., Chou, C. C. (2020). Clarification of sugarcane juice by ultrafiltration membrane: Toward the direct production of refined cane sugar. *Journal of Food Engineering*, 264, 109682. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.07.029>
- Wang, L., Deng, W., Wang, P., Huang, W., Wu, J., Zheng, T., Chen, J. (2020). Degradations of aroma characteristics and changes of aroma related compounds, PPO activity, and antioxidant capacity in sugarcane juice during thermal process. *Journal Of Food Science*, 85(4), 1140-1150. doi: 10.1111/1750-3841.15108
- Wu, W. J., ve Chang, J. (2022). Inactivation of vegetative cells, germinated spores, and dormant spores of *Bacillus atrophaeus* by pulsed electric field with fixed energy input. *Journal of Food Process Engineering*, 45(2). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13959>
- Xi, J., Li, Z., Fan, Y. (2021) Recent advances in continuous extraction of bioactive ingredients from food-processing wastes by pulsed electric fields. *Food Science and Nutrition*, 61, 1738–1750. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1765308>
- Xu, B., Chen, J., Tiliwa, E. S., Yan, W., Azam, S. R., Yuan, J., Wei, B., Zhou, C., Ma, H. (2021). Effect of multi-mode dual-frequency ultrasound pretreatment on the vacuum freeze-drying process and quality attributes of the strawberry slices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 78, 105714, <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105714>
- Xu, B., Tiliwa, E. S., Yan, W., Azam, S. R., Wei, B., Zhou, C., Bhandari, B. (2021). Recent development in high quality drying of fruits and vegetables assisted by ultrasound: A review. *Food Research International*, 44(4), 862-867. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110744>
- Xu, X., Zhang, L., Feng, Y., Yagoub, A. E. A., Sun, Y., Ma, H., Zhou, C. (2020). Vacuum pulsation drying of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench): Better retention of the quality characteristics by flat sweep frequency and pulsed ultrasound pretreatment. *Food Chemistry*, 326, 127026. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127026>
- Yamakage, K., Yamada, T., Takahashi, K., Takaki, K., Komuro, M., Sasaki, K., Aoki, H., Kamagata, J., Koide, S., Orikasa, T. (2021). Impact of pretreatment with pulsed electric field on drying rate and changes in spinach quality during hot air drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 68, 102615. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102615>
- Zhang, C., Lyu, X., Arshad, R. N., Aadil, R. M., Tong, Y., Zhao, W., Yang, R. (2022). Pulsed electric field as a promising technology for solid foods processing: *Food Chemistry*, 134367.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134367>

Zhang, C., Ye, J., Lyu, X., Zhao, W., Mao, J., Yang, R. (2022). Effects of pulse electric field pretreatment on the frying quality and pore characteristics of potato chips. *Food Chemistry*, 369, 130516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130516>

Zia, S., Khan, M. R., Shabbir, M. A., Aslam Maan, A., Khan, M. K. I., Nadeem, M., Khalil, A. A., Din, A., Aadil, R. M. (2022). An inclusive overview of advanced thermal and nonthermal extraction techniques for bioactive compounds in food and food-related matrices. *Food Reviews International*, 38(6), 1166-1196. 10.1080/87559129.2020.1772283

Zimmermann, U. (1986). Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology In: *Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion*, Falsig Pedersen, H.S. (chief ed.), Volume 105. Springer, Heidelberg, Berlin, pp. 175-256.

Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F., (1974). Dielectric breakdown in cell membranes. *Biophysical Journal*, 14(11), 881-899. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(74\)85956-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(74)85956-4)

## 2-FAZLI PİRİNANIN ÖN KURUTULMASININ GEREKLİLİĞİ VE VALSLİ KURUTUCU KULLANIMI

Ulaş Baysan<sup>1,2</sup>, Mehmet Koç<sup>2</sup>, Ali Güngör<sup>3</sup>, Figen Kaymak-Ertekin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova İzmir

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Aydın

<sup>3</sup>Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Makina Mühendisliği Bölümü, Bornova İzmir

Geliş / Received: 23.02.2023; Kabul / Accepted: 11.04.2023; Online baskı / Published online: 05.05.2023

Baysan, U., Koç, M., Güngör, A., Kaymak Ertekin, F. (2023). 2-fazlı pirinanın ön kurutulmasının gerekliliği ve valsli kurutucu kullanımı. GIDA (2023) 48 (3) 562-574 doi: 10.15237/ gida.GD23025

Baysan, U., Koç, M., Güngör, A., Kaymak Ertekin, F. (2023). The necessity of pre-drying 2-phase olive pomace and the usage of drum dryer. GIDA (2023) 48 (3) 562-574 doi: 10.15237/ gida.GD23025

### ÖZ

2-fazlı pirinanın ön kurutma işlemi; seri üretime uygun, kısa kurutma süresine sahip, yüksek miktarda pirina kurutabilmeye imkân sağlayan valsli kurutucuda gerçekleştirilmiştir. Valsli kurutucu işlem değişkenlerinden farklı buhar basıncı (1, 2, 3 ve 4 bar) değerlerine karşılık, farklı vals dönme hızlarında (1, 3 ve 6 devir/dakika) 2-fazlı pirinanın kurutulması denemeleri gerçekleştirilmiştir. Valsli kurutucuda buhar basıncının artması ve/veya vals dönme hızının azaltılması ile yarı kurutulmuş 2-fazlı pirinanın % titrasyon asitliği, peroksit, serbest yağ asitliği ve K232, K270 değerlerinde artış görülürken, ürünün nem içeriği, su aktivitesi ve pH değerleri ise azalmıştır. Valsli kurutucuda yüksek buhar basıncında ve dönme hızında (4 bar 6 dev/dak) gerçekleştirilen kurutma denemesinin diğer denemelere kıyasla daha yüksek enerji verimliliği ve etkin bir kuruma performansına sahip olduğu belirlenmiştir. Kurutucu sistemlerde etkin kurutma performansının ve yüksek enerji verimliliğinin sağlanabilmesi için; maksimum özgül nem alma hızı (SMER), maksimum nem alma hızı (MER) ve minimum özgül enerji tüketimi (SEC) değerlerine sahip olması beklenmektedir.

**Anahtar kelimeler:** 2-fazlı pirina, valsli kurutucu, enerji verimliliği, atık değerlendirme, kalite

## THE NECESSITY OF PRE-DRYING 2-PHASE OLIVE POMACE AND THE USAGE OF DRUM DRYER

### ABSTRACT

Pre-drying of 2-phase olive pomace was carried out by parametric drying using a drum dryer supplying continuous mass production with a short drying time and obtaining the high amount of drying sample. Drying experiments of 2-phase pomace were performed at different valse rotational speeds (1, 3, and 6 rev/min) and different vapor pressure values (1, 2, 3, and 4 bar) as drum dryer process variables. Increasing the vapor pressure and decreasing the valse rotational speed increased the titratable acidity, peroxide value, free fatty acid and K232, K270 values of pre-dried 2-phase olive pomace whereas decreased the moisture content, water activity and pH value. The effective conditions of the drum dryer were determined at high vapor pressure and high valse rotational speed

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author:

✉: figen.ertekin@ege.edu.tr

☎: (+90) 232 388 2395

☎: (+90) 232 342 7592

Ulaş Baysan; ORCID no: 0000-0002-6307-9874

Mehmet Koç; ORCID no: 0000-0002-7295-7640

Ali Güngör; ORCID no: 0000-0003-0011-4192

Figen Kaymak Ertekin; ORCID no: 0000-0001-5042-3659

(4 bar and 6 rpm). Maximum specific moisture extraction rate (SMER), moisture extraction rate (MER) and minimum specific energy consumption (SEC) values were expected to determine the high performance and energy efficient dryer system.

**Keywords:** 2-phase olive pomace, Drum dryer, energy efficiency, waste valorization, quality

### GİRİŞ

Akdeniz uygarlıklarının vazgeçilmez parçası olan zeytin; Anadolu'nun en eski kültür bitkilerinden biridir (Vural vd., 2021). Akdeniz tarzı beslenmeye olan ilginin gün geçtikçe artmasıyla insanların zeytinyağına olan taleplerinde de artış görülmektedir. Bu artış sonucunda zeytinin yağını, çekirdeğini ve etini içeren değerli bir atık olan pirina miktarının artacağı öngörülmektedir (Kılıç, 2020; Arslan vd., 2021). Zeytinyağı sürekli üretim sistemleri, açığa çıkan atık çeşidine göre; 3-faz ve 2-faz ekstraksiyon sistemleri olarak isimlendirilir. 3-faz ekstraksiyon sistemlerinde üç fazlı santrifüj sistemleri sayesinde zeytin hamurundan yağ, su ve pirina ayrı ayrı elde edilir (Ranalli ve Martinelli, 1995). Proses suyu kullanılmayan 2 faz ekstraksiyon sistemlerinde ise zeytinin tüm meyve suyu pirina içinde yer almaktadır. Üç fazlı sistemlerde kullanılan suyun çevre kirliliğine yol açması sebebiyle; proses suyunun kullanılmadan veya zeytinin nem içeriğine bağlı olarak çok az kullanılması ile yağ fazının ayrılmasını sağlayan 2 faz ekstraksiyon sistemi geliştirilmiştir. Ekolojik sistemler olarak da adlandırılan bu sistemin gün geçtikçe kullanımı yaygınlaşmakta ve önem kazanmaktadır (Ranalli ve Martinelli, 1995). Zeytinyağı üretim sistemlerindeki ekstraksiyon tekniğinin farklılığı, oluşan atık suyun miktarı ve kirlilik özelliklerinde ve pirinanın kompozisyonunda farklılıklara sebep olmaktadır.

Pirina genellikle hayvan yemi katkı maddesi olarak, bahçe bitkilerinin yetiştirilmesinde (Dermeche vd., 2013) ve toprağın güçlendirilmesinde gübre olarak (Paredes vd., 2001) ve kükürt içermeyen alternatif yakıt olarak kullanılmaktadır (Çelen vd., 2015). Ayrıca, pirinadan fermantasyon yoluyla lipaz enzimi, hidroliz ile aktif karbon (Lama-Muñoz vd., 2019; Borjan vd., 2020) ve biodizel (Hernández vd., 2014) de elde edilmektedir (Temur ve Temiz, 2018; Kaya ve Demir 2020, Salık ve Çakmakçı 2021). Pirinanın direkt olarak doğaya salınımı yerine katma değeri yüksek bir yan ürün olarak değerlendirilmesi için pirinanın kurutulması

gerekmektedir. Pirinanın işlenebilirliğini ve dayanıklılığını artırmak kurutma işlemiyle mümkün kılınabilmektedir. Yüksek tonlarda ürün kurutmaya ve seri üretime uygun olması nedeniyle pirina kurutma işlemi genellikle döner kurutucularda 400 ile 800°C aralığında gerçekleştirilir. Bu tip kurutma sistemlerinde sıcak kurutma gazı farklı yöntemler ile elde edilmekte; son yağı da çekilmiş olan pirinanın ve/veya üründen ayrılan çekirdeklerin yakılması ile elde edilen sıcak gaz ve kojenerasyon sistemlerindeki türbin veya gaz motorlarından elde edilen atık gaz kullanılmaktadır (Moral ve Méndez, 2006). 2-fazlı pirinanın nem içeriğinin yüksek olması kurutma sırasında nemli bölgelerin kalmasına ve ürünün düşük ısı stabilitesinden kaynaklı olarak kurutucu duvarlarına yapışmasına neden olmaktadır. Bu durum kurutucuda alevlenme riskini de beraberinde getirmektedir (Arjona vd., 2005). Bu sebeplerden dolayı 2-faz pirina direkt olarak kurutuculara beslenememektedir. Sanayide kalıcı olmayan çözümlerle 2-faz pirina kurutma çalışmaları sürdürülmektedir. 2-faz pirina ile 3-faz pirina karıştırılarak; karışım kurutucuya beslenmektedir. Bu yöntemde ilk olarak 3-fazlı pirina % 20-25 nem içeriğine kadar kurutulur daha sonra 2-fazlı pirinayla karıştırılarak nem içeriği % 50-55 civarına getirilir ve daha sonra kurutucuya beslenerek kuruma gerçekleştirilir (Arjona vd., 2005). Kurutma sıcaklığının çok yüksek olması, kurutma işleminde baca gazlarının ısıtıcı ortam olarak kullanılması ve pirinanın tekrar tekrar kurutma işlemine maruz bırakılmasından dolayı elde edilen kuru pirinanın katma değeri azalmaktadır.

Torrecilla vd. (2005) 2-faz pirinayı kurutmak için akışkan yatak kurutucu kullanmışlardır. 2-faz pirinayı direkt olarak kurutma işlemini gerçekleştiremeyip, çözümü 70/30 ve 90/10 yaş/kuru pirina oranlarında karıştırmada bulmuşlardır. Bu kurutma işleminde pirinanın nem içeriğini %65'den %8'e kadar düşürmeyi başarmışlardır. Akışkan yatak kurutucununun hem kurutucu maliyetinin yüksek hem de ön işlem

gereksinimi olması dezavantajları arasındadır (Torrecilla vd., 2005). Arjona vd. (2005) döner tip kurutucuda 2-faz pirinayı kurutma işlemini gerçekleştirmiştir. 2-faz pirinanın yüksek nemlilik ve şeker içeriğinden dolayı işlem süresinin çok uzadığını aynı zamanda tam etkin bir kurutmanın gerçekleştirilemediğini vurgulamışlardır (Arjona vd., 2005). Milczarek vd. (2011); mikrodalga ve geleneksel kurutma yöntemlerinin kombine çalışmasına olanak sağlayan kurutucu sistem kullanmışlar ve kurutma karakteristiğini incelemişlerdir. Çalışmada işlem süresinin uzunluğuna dikkat çekilmiştir. İnce tabaka halinde kurutma gerçekleştirildiğinde 70°C ve altındaki sıcaklık uygulamalarında pirinanın büzüşmesinin ihmal edilebilir olduğu belirtilmiştir (Milczarek vd., 2011). Mevcut kurutucu sistemler ile 3-fazlı ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen pirinanın kurutulması gerçekleştirilmesine karşın; 2-fazlı pirinanın ön işlem (3-fazlı pirina ile karıştırmak veya santrifüj ile karasuyu ayırmak gibi) gereksinimi duymaksızın %8-10 nem içeriğine kadar kurutulması etkin bir şekilde gerçekleştirilememektedir. Bu çalışmada; 2-faz pirinanın ön kurutma işlemi gerçekleştirilerek 3-fazlı pirinanın etkin kurutulmasını sağlayan kurutuculara beslenmeye uygun hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Seri üretime uygun, kısa kurutma süresine sahip ve yüksek miktarda pirina kurutabilmeye imkân sağlayan valsli kurutucuda kurutma denemeleri gerçekleştirilmiştir. Valsli kurutucuda gerçekleştirilen 2-faz pirina kurutma denemelerinde buhar basıncı ve vals dönme hızı bağımsız değişkenlerinin pirinanın kalitesine ve enerji verimliliklerinin üzerine etkisi incelenmiştir.

## MATERYAL YÖNTEM

### Materyal

2-faz pirina Aydın ili çevresinde 2-faz zeytinyağı üretimi gerçekleştiren yerel bir firmadan temin edilmiştir. 2-faz pirina kurutma işlemine kadar -25°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Depolanan pirinalar kurutma denemesinin 1 gün öncesinde buzdolabında (4°C) çözündürülerek denemeler için uygun sıcaklığa getirilmiştir.

### Kurutma Denemeleri

2-faz pirinanın ön kurutulması çalışmaları valsli kurutucuda (drum dryer-vapor, Carter, USA)

gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Valsli kurutucu 2 adet valsten oluşmakta ve her bir valsın dış çapı 26 cm ve genişliği 20 cm'dir. 2 vals arasındaki vals açıklığı ön denemeler sonucunda pirinanın çekirdeğine zarar vermeyecek şekilde 3 mm olarak belirlenmiş ve tüm denemelerde sabit tutulmuştur. Her deneme için 2-faz pirinadan 1 kg alınarak valsli kurutucuya beslenip kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Valsli kurutucuda bağımsız değişkenler buhar basıncı ve vals dönme hızı olarak belirlenmiştir. Buhar basıncı değerlerinin (1, 2, 3 ve 4 bar) her biri için farklı vals dönme hızı değerlerinde (1,3 ve 6 dev/dak) 2-fazlı pirina kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Her kurutma denemesi 2 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Kurutma prosesleri esnasında, buhar basıncı ve tüketimleri (kondenstop çıkışında yoğunlaşan su ölçümü ile), kurutmaya harcanan enerji için de başlangıç ve son pirina nem içerikleri, kütle debisi ve kurutma zamanı ölçümleri ile belirlenmiştir. Enerji ve performans göstergesi analizlerinde bu veriler kullanılmıştır.

### Analizler

#### *Pirinaya uygulanan analizler*

*Nem içeriği:* Yaş ve kurutulmuş pirina örneklerinin nem içerikleri vakumlu etüv yöntemi ile belirlenmiştir AOAC, (1980). Nem miktarları % yaş temel olarak ifade edilmiştir.

*Su aktivitesi ( $a_w$ ):* Pirinanın su aktivitesi,  $\pm 0.001$  hassasiyete sahip su aktivitesi ölçüm probu (Testo- AG 400, Germany) kullanılarak belirlenmiştir.

*pH:* pH değerinin elektrometrik olarak dijital pH metre (inoLab pH/Cond 720, WTW, Germany) ile ölçümü yapılmıştır (Cemeroğlu, 2007).

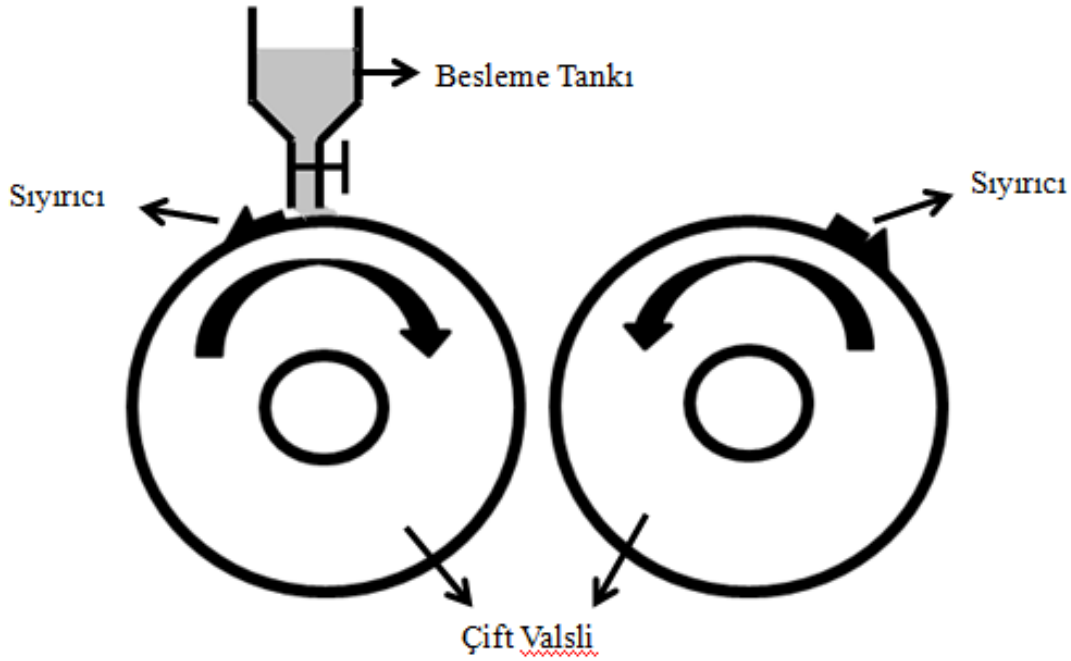
*% Titrasyon asitliği:* Yaş ve kuru pirinaların % titrasyon asitliği değerleri NaOH çözeltisiyle titre edilerek belirlenmiştir. Sonuç % oleik asit cinsinden belirtilmiştir (Cemeroğlu, 2007).

### Pirinadan Elde Edilen Yağa Uygulanan Analizler

Pirinadan elde edilen yağ analizleri için öncelikle pirinadan yağın ekstrakte işlemi soğuk ekstraksiyon uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

Soğuk ekstraksiyon sonucunda elde edilen çözgen-yağ karışımları 50°C'de döner buharlaştırıcıda (Heidolph, Germany) evapore

edilmiştir. Elde edilen yağlar analizlere tabii tutulmuştur.



Şekil 1. Valsli Kurutucu Şematik Gösterimi  
Figure 1. Diagram of Drum Dryer

**Peroksit:** Yağ elde edildikten sonra peroksit analizi için 0.5 gr yağ 3 ml asetik asit/kloroform (3:2 v/v) ile çözülmüş ve üzerine 50 µl doymuş potasyum iyodür çözeltisi ilave edilip, 1 dakika karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta beletildikten sonra üzerine 3 ml su ilave edilmiştir. İndikatör olarak 0.2 ml nişasta (1 gr/100 ml) eklenip ve mavi renk elde edilerek; 0.01 N standardize sodyum tiyosülfat çözeltisi ile mavi renk kaybolana kadar titrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Peroksit değerinin hesaplanabilmesi için kör deneme de yapıldıktan sonra hesaplama yapılmıştır (AOAC, 1990).

**Serbest yağ asitliği:** Yağın ekstrakte edilmesinin ardından serbest yağ asitliğinin belirlenebilmesi için 1.25 ml saf etanole 1-2 damla yağ ve 50 µl fenolftalein ilave edilerek nötrale alkol hazırlanmıştır. Bu karışım 60°C su banyosunda ısıtılıp ve 0.01 N KOH ile açık-sabit pembe renk

elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Titrasyondan sonra 1.41 gr yağ örneği nötrale alkol üzerine ilave edilip ve aynı renk elde edilinceye kadar 0.01 N KOH ile tekrar titre edilmiştir. Sonuç, örneğimiz zeytinyağı olduğu için oleik asit cinsinden ifade edilmiştir (Göğüş vd., 2009).

**UV Işığında özgül soğurma değerleri ( $K_{232}$ ,  $K_{270}$ ):** 0.5 g yağ 50 ml'lik balonjojeye 0.0001 duyarlılıkta tartıldıktan sonra sikloheksanla 50 ml'ye tamamlanıp çalkalanmıştır. 1 cm kalınlığındaki kuvarz küvetler kullanarak, sikloheksana karşı 232 nm ve 270 nm'de absorpsiyon ölçümü yapılmıştır (Göğüş vd., 2009).

**Kurutma Sistemlerinde Verim Tanımlamaları**  
Kurutucu sistemlerin etkinliğinin belirlenebilmesi için özgül nem alma hızı, nem alma hızı ve özgül enerji tüketimi kriterlerinden yararlanılmıştır.

**Özgül nem alma hızı (SMER):** Kurutucuların enerji verimliliği genellikle özgül nem uzaklaştırma (SMER: Specific Moisture Extraction Rate) hızı ile belirlenmektedir. 1 kg nemli havadan nemi çekmek için harcanan enerji miktarı “özgül nem çekme oranı (SMER)” olarak tanımlanır. Bu büyüklük birim  $kWh$  enerji kullanımı için, kurutulacak üründen uzaklaştırılan su kütlesini gösterir ( $kg_w / kWh$ ). Eşitlik (1) kullanılarak özgül nem alma hızı hesaplanmıştır (Hawladar ve Jahangeer, 2006).

$$SMER = \frac{\text{Üründen Uzaklaştırılan Nem kütlesi}}{\text{Enerji Girişi}} \left( \frac{kg_w}{kWh} \right) \quad (1)$$

**Nem alma hızı (MER):** Kurutucudan birim zamanda uzaklaştırılan nemin kütlesi olarak tanımlanır (MER: Moisture Extraction Rate) ve Eşitlik (2)'ye göre hesaplanmıştır (Gürlek vd., 2015).

$$MER = \frac{\text{Üründen Uzaklaştırılan Nem}}{\text{Kuruma Süresi}} \left( \frac{kg_w}{h} \right) \quad (2)$$

**Özgül enerji tüketimi (SEC: Spesific Energy Consumption):** Özgül enerji tüketimi örneklerin kurutulması sırasında, örneklerden birim miktarda suyu uzaklaştırmak için gerekli enerji miktarı olarak tarif edilerek, kJ/kg olarak ifade edilmiştir ve aşağıdaki eşitlikten (Eş.(3)) hesaplanmıştır (Sadi vd., 2015).

$$SEC = \frac{\text{Sisteme Giren Toplam Enerji}}{\text{Üründen Uzaklaştırılan Suyun Kütlesi}} \left( \frac{kJ}{kg} \right) \quad (3)$$

### İstatistiksel Analiz

Bağımsız işlem değişkenleri olarak belirlenen buhar basıncı ve vals dönme hızının pirinanın kalite özellikleri ve enerji verimliliği üzerine olan etkisi Design Expert Ver. 7.0.0 (Stat-Ease, 2005) paket program kullanılarak incelenmiştir. Oluşturulan modellerin deneysel veriler üzerindeki etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Her bir bağımsız değişkenin tüm deneysel veriler için lineer, quadratik ve interaksiyon etkileri incelenmiş ve her yanıt için regresyon katsayıları bulunmuştur. İstatistiksel analizler SPSS, 2006 (15.0 for Windows) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Model uygunluklarının kontrol edilmesi için de R<sup>2</sup> ve adj-R<sup>2</sup> terimlerinden yararlanılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Nem İçeriği

Başlangıç nem içeriği % 66.4 olan 2-faz pirina Çizelge 1’de verilen farklı işlem koşullarında valsli kurutucuda kurutulmuştur. Yarı kurutulmuş 2-faz pirinaların fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları Çizelge 1’de ve bu analizlerin ANOVA sonuçları da Çizelge 2 de verilmiştir.

Çizelge 1. Valsli kurutucuda yarı kurutulmuş 2-faz pirinanın fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları

Table 1. Results of the physical and chemical analysis of semi-dried 2-phase pomace by drum dryer

| No | Pirinada Yapılan Analizler |           |                 | Yağda Yapılan Analizler |           |                      |   |                                |                  |                  |
|----|----------------------------|-----------|-----------------|-------------------------|-----------|----------------------|---|--------------------------------|------------------|------------------|
|    | $\beta_1$                  | $\beta_2$ | Nem İçeriği (%) | $a_w$                   | pH        | % Titrasyon Asitliği | Peroksit Değeri (meqO <sub>2</sub> /kg yağ) | Serb. Yağ Asit. (% Oleik Asit) | K <sub>232</sub> | K <sub>270</sub> |
| 1  | 1                          | 1         | 45.68±0.72      | 0.964±0.003             | 5.21±0.01 | 0.38±0.01            | 8.40±0.20                                   | 0.17±0.01                      | 0.35±0.02        | 0.19±0.01        |
| 2  | 1                          | 3         | 56.21±0.79      | 0.981±0.003             | 5.26±0.01 | 0.36±0.02            | 7.26±0.73                                   | 0.16±0.01                      | 0.30±0.01        | 0.18±0.01        |
| 3  | 1                          | 6         | 59.94±1.16      | 0.990±0.000             | 5.30±0.02 | 0.32±0.01            | 5.02±0.03                                   | 0.13±0.01                      | 0.28±0.01        | 0.17±0.01        |
| 4  | 2                          | 1         | 39.83±0.73      | 0.945±0.005             | 5.19±0.03 | 0.39±0.04            | 9.15±0.51                                   | 0.23±0.01                      | 0.42±0.01        | 0.22±0.01        |
| 5  | 2                          | 3         | 49.12±1.52      | 0.969±0.003             | 5.29±0.01 | 0.38±0.01            | 7.86±0.34                                   | 0.22±0.01                      | 0.39±0.01        | 0.20±0.01        |
| 6  | 2                          | 6         | 56.70±0.30      | 0.973±0.002             | 5.32±0.01 | 0.32±0.01            | 5.47±0.01                                   | 0.20±0.01                      | 0.33±0.01        | 0.19±0.01        |
| 7  | 3                          | 1         | 27.92±0.76      | 0.930±0.002             | 5.16±0.02 | 0.40±0.06            | 9.81±0.74                                   | 0.29±0.01                      | 0.49±0.01        | 0.25±0.01        |
| 8  | 3                          | 3         | 41.54±0.11      | 0.947±0.002             | 5.24±0.01 | 0.38±0.03            | 8.58±0.10                                   | 0.28±0.01                      | 0.40±0.01        | 0.23±0.01        |
| 9  | 3                          | 6         | 52.82±1.10      | 0.964±0.003             | 5.25±0.01 | 0.33±0.03            | 6.00±0.17                                   | 0.24±0.01                      | 0.36±0.01        | 0.22±0.01        |
| 10 | 4                          | 1         | 22.88±1.41      | 0.877±0.004             | 5.12±0.01 | 0.44±0.02            | 10.73±0.74                                  | 0.37±0.01                      | 0.53±0.01        | 0.33±0.02        |
| 11 | 4                          | 3         | 37.35±0.61      | 0.924±0.004             | 5.20±0.01 | 0.40±0.06            | 9.55±0.44                                   | 0.32±0.01                      | 0.48±0.02        | 0.29±0.02        |
| 12 | 4                          | 6         | 45.97±0.52      | 0.944±0.003             | 5.22±0.01 | 0.35±0.07            | 6.43±0.14                                   | 0.29±0.01                      | 0.38±0.02        | 0.25±0.02        |

$\beta_1$  : Buhar basıncı (bar);  $\beta_2$ : Dönme hızı (dev/dak)

$\beta_1$  : vapor pressure (bar);  $\beta_2$  : Valse rotational speed (rpm)

Çizelge 2. Valsli kurutucuda yarı kurutulmuş 2-fazlı pirinanın fiziksel ve kimyasal analiz sonuçlarına ait ANOVA sonuçları

Table 2. ANOVA results of the physical and chemical analysis results of semi-dried 2-phase pomace by drum dryer

| Varyasyon Kaynağı  | Pirinada Yapılan Analizler |          |         |                      | Yağda Yapılan Analizler                      |                                     |                  |                  |
|--------------------|----------------------------|----------|---------|----------------------|--|-------------------------------------|------------------|------------------|
|                    | Nem İçeriği (%)            | $a_w$    | pH      | % Titrasyon Asitliği | Peroksit Değeri (meq O <sub>2</sub> /kg yağ) | Serbest Yağ Asitliği (% Oleik Asit) | K <sub>232</sub> | K <sub>270</sub> |
| Model              | <0.0001                    | 0.0001*  | 0.0006* | <0.0001*             | <0.0001*                                     | <0.0001*                            | <0.0001*         | <0.0001*         |
| $\beta_1$          | <0.0001                    | <0.0001* | 0.0007* | 0.0002*              | <0.0001*                                     | <0.0001*                            | <0.0001*         | <0.0001*         |
| $\beta_2$          | <0.0001                    | 0.0002*  | 0.0001* | <0.0001*             | <0.0001*                                     | 0.0004*                             | <0.0001*         | 0.0007*          |
| $\beta_1 \beta_2$  | 0.0139                     | 0.0251*  | 0.8909  | 0.0890               | 0.0041*                                      | 0.0491*                             | 0.0120*          | 0.0135*          |
| $\beta_1^2$        | 0.9874                     | 0.0947   | 0.0598  | 0.0496*              | 0.2011                                       | 0.8881                              | 0.1901           | 0.0298*          |
| $\beta_2^2$        | 0.0060                     | 0.0375*  | 0.0154* | 0.2686               | 0.0034*                                      | 0.6804                              | 0.2400           | 0.2053           |
| R <sup>2</sup>     | 0.9895                     | 0.9739   | 0.9552  | 0.9838               | 0.9982                                       | 0.9896                              | 0.9843           | 0.9790           |
| Adj-R <sup>2</sup> | 0.9808                     | 0.9522   | 0.9179  | 0.9703               | 0.9966                                       | 0.9808                              | 0.9712           | 0.9614           |

$\beta_1$  : Buhar basıncı (bar);  $\beta_2$  : Dönme hızı (dev/dak)

$\beta_1$  : vapor pressure (bar);  $\beta_2$  : Valse rotational speed (rpm)

\* $P < 0.05$  düzeyinde önemli

\*significant at  $P < 0.05$

Denemeler sonucunda kurutulmuş pirinanın nem içeriği %22.88-59.94 aralığında değişmektedir (Çizelge 1). Düşük buhar basıncında ve yüksek vals dönme hızında (1 bar, 6 dev/dak) kurutulmuş pirina en yüksek nem içeriğine sahipken, yüksek buhar basıncı ve düşük vals dönme hızında (4 bar, 1 dev/dak) ise en düşük nem içeriğine sahiptir. Kuruma denemelerinde ürünün sıcak yüzeyle temas etme süresi valslerin dönme hızına bağlı olup, vals dönme hızının yükselmesiyle birlikte kurutma işleminin süresi azalmaktadır. Bu nedenle valsın dönme hızı arttıkça ürünün nem içeriği daha yüksek değerlerde kalmaktadır. Buhar basıncı ise kurutucu yüzey sıcaklığını artırması nedeniyle buhar basıncı arttıkça 2-faz pirinanın kuruması hızlanmakta ve nem içeriği daha düşük ürün elde edilmektedir (Şekil 2). Valsli kurutucuda gerçekleştirilen kurutma işlemlerinde; buhar basıncı ve vals dönme hızının pirinanın nem içeriği üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ANOVA analizi (Çizelge 2) ile belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ).

### Su Aktivitesi

Kurutma işleminin birincil amaçlarından biri de ürünün su aktivitesi değerini azaltarak mikroorganizma gelişimini engellemektir (Seçkin

ve Taşeri, 2015). 2-faz pirinaların ön kurutma işlemi uygulanmasıyla su aktivitesi ( $a_w$ ) değerlerinin değişimi büyük önem arz etmektedir. Farklı işlem koşullarında valsli kurutucuda kurutulmuş 2-faz pirinaların su aktivitesi değerleri 0.877-0.990 arasında değişim göstermektedir (Çizelge 1). Bu aralıktaki değerler mikroorganizmaların faaliyetinin durdurulması için yeterli değildir. Fakat 2-fazlı pirinaya uygulanan kurutma işleminin ön kurutma işlemi olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Yarı kurutulmuş 2-fazlı pirinanın  $a_w$  değerleri buhar basıncının artmasıyla artış gösterirken; vals dönme hızının artmasıyla azalmaktadır (Şekil 2). Kurutulmuş pirinanın su aktivitesinin buhar basıncı ve vals dönme hızına bağlı olarak değişimi nem içeriği ile oldukça benzerdir. ANOVA sonuçlarına göre buhar basıncının ve vals dönme hızının 2-fazlı pirinanın su aktivitesi değerleri üzerine de etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir (Çizelge 2,  $P < 0.05$ ).

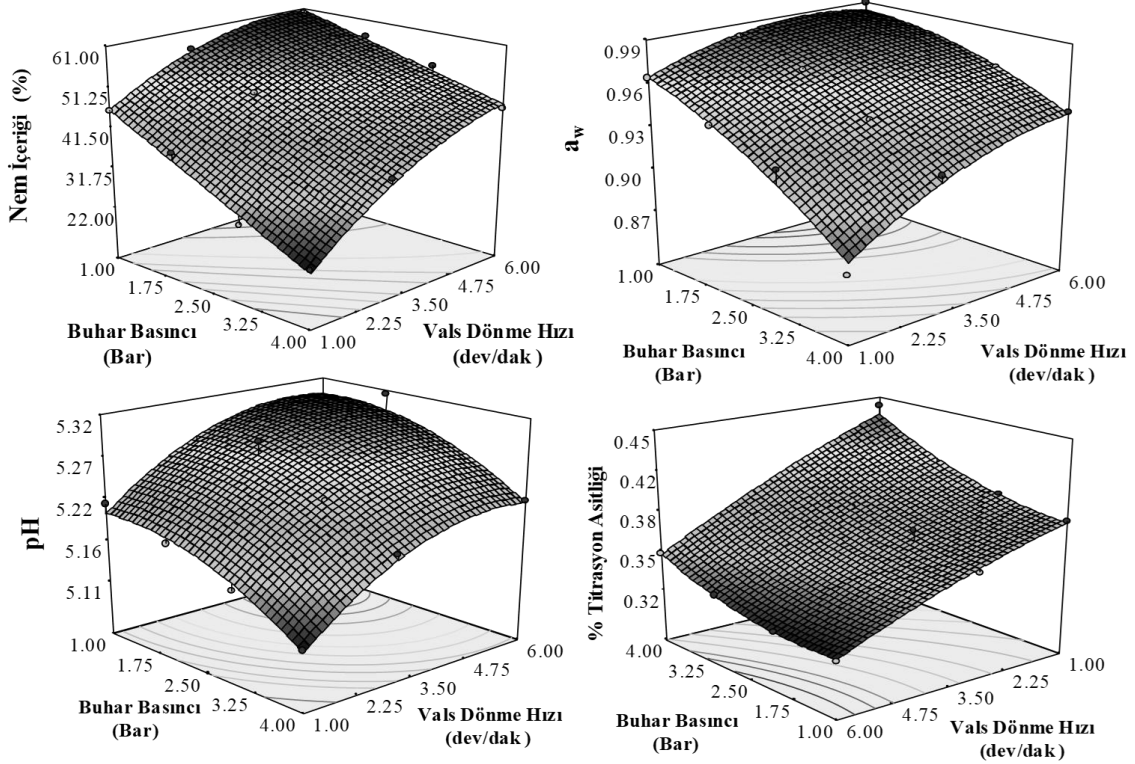
### Titre Edilebilir Asitlik ve pH

Titre edilebilir asitlik ve pH mikrobiyal gelişmeyi ve oluşan son ürünlerdeki kimyasal ve fiziksel değişimleri etkileyen önemli faktörlerden biridir (Erbay vd., 2010). Valsli kurutucuda yarı kurutulmuş 2-fazlı pirina için pH değerleri ile %



titrasyon asitliği değerleri paralellik göstermektedir. Yüksek buhar basıncında ve düşük vals dönme hızında yapılan kurutma işlemi sonucunda elde edilen ürün en düşük pH değerine (5.12) ve en yüksek % titre edilebilir asitlik değerine (% 0.443) sahiptir. En yüksek pH değeri (5.30) ve en düşük % asitlik değeri (% 0.322) ise 1 bar ve 6 dev/dak kurutma uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 1). Yarı kurutulmuş 2-fazlı pirinanın pH değerleri ve % titrasyon asitliği değerlerinin bu koşullar altında dar bir aralıkta

değişim gösterdiği gözlenmiştir. Kurutma işleminde bağımsız değişkenlerden buhar basıncının artması ile pH değerinin azaldığı ve % titrasyon asitliği değerinin arttığı; vals dönme hızının artması ile pH değerinin arttığı ve % titrasyon asitliği değerinin azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 2). İstatistiksel olarak da buhar basıncının ve vals dönme hızının hem pH değerleri hem de % titrasyon asitliği değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ) olduğu bulgulanmıştır (Çizelge 2).



Şekil 2. Valsli kurutucuda yarı kurutulmuş 2-fazlı pirinanın nem içeriği (%),  $a_w$ , pH, % titrasyon asitliği değerlerinin değişiminin 3 boyutlu gösterimi

Figure 2. 3-D representation of the change in moisture content (%),  $a_w$ , pH, % titration acidity values of semi-dried 2-phase pomace in drum dryer

### Peroksit

Peroksit değeri kurutma işlemi sırasında yağın oksidasyon derecesini belirlemeyi sağlayan bir göstergedir (Sun-Waterhouse vd., 2011). Valsli kurutucu işlem değişkenlerinden buhar basıncının artması kurutucu yüzey sıcaklığının artmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda yüksek kurutucu yüzey sıcaklığı uygulamasıyla yarı kurutulmuş 2-fazlı pirinalardan elde edilen yağların peroksit değerleri artmaktadır. Genellikle

ısı işlemin artmasıyla peroksit değeri artış göstermektedir (Zungur vd., 2014). Vals dönme hızının yükselmesi ise vals kuruma yüzeyi ile 2-fazlı pirinanın temas süresinin azalmasını sağlayarak yarı kurutulmuş ürünlerin peroksit değerlerinin azalmasına neden olmaktadır (Çizelge 1 ve Şekil 3). Buhar basıncı ve vals dönme hızının peroksit değerleri üzerine istatistiksel olarak etkili olduğu bulunmuştur (Çizelge 2,  $P<0.05$ ). Vals dönme hızının ise buhar basıncına

göre daha etkin bir parametre olduğu belirlenmiştir.

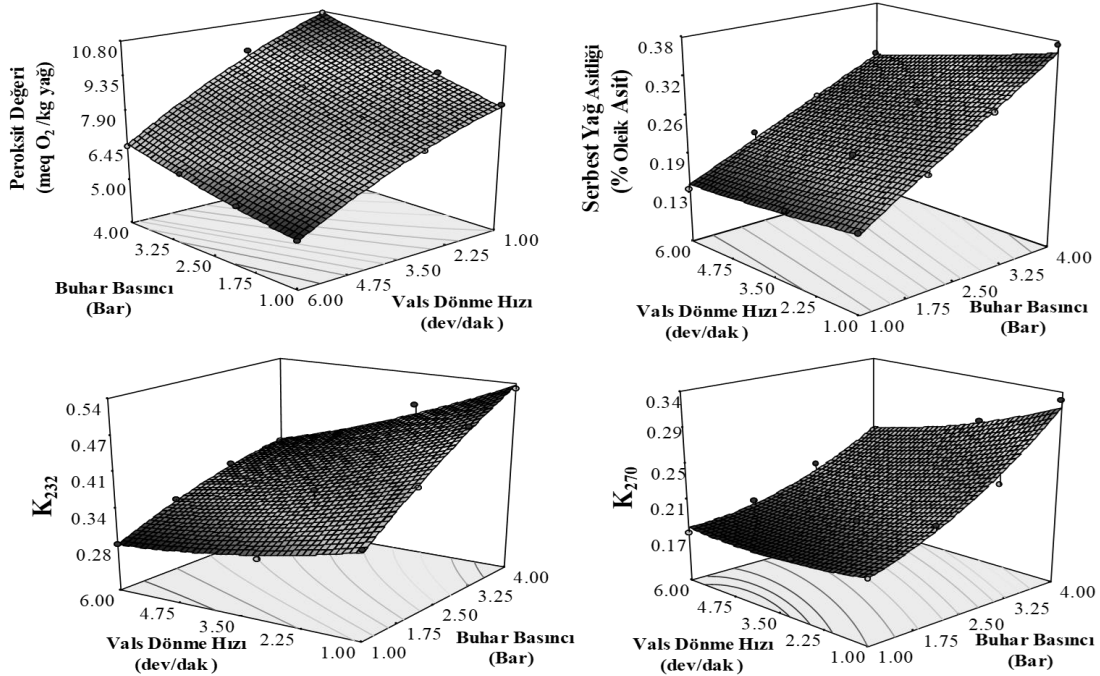
### Serbest Yağ Asitliği

Serbest yağ asidi genellikle yağ bozunmalarının göstergesi olarak kabul edilmektedir (Kıvrak vd., 2016). Genellikle yüksek sıcaklıklarda yağda gerçekleşen hidroliz sonucunda trigliseridlerin parçalanması ile oluşmaktadır (Bensmira vd., 2007). Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Prina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği'ne göre (TGK, 2014); pirina yağının serbest asitliğinin (oleik asit cinsinden) % 1'in altında olması istenmektedir. Valsli kurutucuda kurutulmuş pirinadan elde edilen yağların serbest yağ asitliği değerleri % 0.135 ile % 0.373 değerleri arasındadır (Çizelge 1). Bu değerler % 1 in altında olması tam kuruma işleminin gerçekleştirilmemesinin yanı sıra pirinanın kalite kayıplarının minimumda tutulduğunu göstermektedir. Serbest yağ asitliği değerleri buhar basıncının artmasıyla artış göstermekte ve vals dönme hızının artmasıyla ise azalış göstermektedir (Şekil 3). Buhar basıncının serbest yağ asitliği üzerine daha etkin bir parametre olduğu

belirlenmesine rağmen; istatistiksel olarak her iki parametre buhar basıncı ve vals dönme hızının serbest yağ asitliği üzerine etkili olduğu bulgulanmıştır (Çizelge 2,  $P<0,05$ ).

### $K_{232}$ ve $K_{270}$ değerleri

Yağ örneklerinin  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerleri, konjuge dien ve trien niceliklerinin ve oksidasyon seviyelerinin göstergesi olarak kullanılmaktadır (Köseoğlu, 2006). 2-faz pirinanın valsli kurutucuda gerçekleştirilen ön kurutma işleminde yarı kurutulmuş pirinadan elde edilen yağların  $K_{232}$  değerlerinin 0.281-0.531 ve  $K_{270}$  değerlerinin ise 0.173-0.288 aralığında oldukları belirlenmiştir (Çizelge 1). Buhar basıncının artması ve vals dönme hızının azalması ile  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerlerinin arttığı bulgulanmıştır (Şekil 3). En az süre kurutma yüzeyine maruz kalmış ve en düşük buhar basıncında yapılan deneme (1 bar, 6 dev/dak) sonucunda kurutulan pirinaların  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerleri daha düşüktür. İki bağımsız değişkenin de K değerleri üzerine istatistiksel olarak etkisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2,  $P<0,05$ ).



Şekil 3. Valsli kurutucuda yarı kurutulmuş 2-faz pirinadan elde edilen yağın peroksit değeri, serbest yağ asitliği,  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerlerinin değişiminin 3 boyutlu gösterimi

Figure 3. 3-D representation of the change in peroxide value, free fatty acidity,  $K_{232}$  and  $K_{270}$  values of oil obtained from semi-dried 2-phase pomace in drum dryer

**Valsli Kurutucu Sistemin Enerji Verimliliğinin İncelenmesi**

Yarı kurutulmuş 2-faz pirinanın valsli kurutucu sistem etkinliğinin belirlenmesi için Eşitlik (1), (2)

ve (3)'te verilen özgül nem alma hızı (SMER), nem alma hızı (MER) ve özgül enerji tüketimi (SEC) sonuçları Çizelge 3'de ve bu sonuçlara ait ANOVA değerlendirmesi Çizelge 4'de verilmiştir.

Çizelge 3. Valsli kurutucu sistem verimliliği sonuçları

Table 3. Drum dryer system efficiency results

| No | Bağımsız Değişkenler |           | Kurutma Sistemlerinde Verim Tanımlamaları |                     |                    |
|----|----------------------|-----------|---|---------------------|--------------------|
|    | $\beta_1$            | $\beta_2$ | SMER<br>( $kg_w/kWh$ )                    | MER<br>( $kg_w/h$ ) | SEC<br>( $kJ/kg$ ) |
| 1  | 1                    | 1         | 0.102 ±0.001                              | 6.22 ±0.51          | 9.77 ±0.71         |
| 2  | 1                    | 3         | 0.092 ±0.001                              | 6.90 ±0.21          | 10.90 ±0.12        |
| 3  | 1                    | 6         | 0.247 ±0.001                              | 5.94 ±0.18          | 4.04 ±0.32         |
| 4  | 2                    | 1         | 0.079 ±0.002                              | 7.23 ±0.36          | 12.58 ±0.63        |
| 5  | 2                    | 3         | 0.091 ±0.001                              | 10.24 ±0.12         | 11.00 ±0.67        |
| 6  | 2                    | 6         | 0.235 ±0.001                              | 8.43 ±0.09          | 4.26 ±0.11         |
| 7  | 3                    | 1         | 0.073 ±0.001                              | 8.78 ±0.04          | 13.64 ±0.45        |
| 8  | 3                    | 3         | 0.087 ±0.001                              | 12.91 ±0.43         | 11.48 ±0.77        |
| 9  | 3                    | 6         | 0.232 ±0.002                              | 10.97 ±0.29         | 4.31 ±0.34         |
| 10 | 4                    | 1         | 0.062 ±0.001                              | 9.29 ±0.31          | 16.06 ±0.61        |
| 11 | 4                    | 3         | 0.076 ±0.002                              | 14.11 ±0.14         | 13.09 ±0.58        |
| 12 | 4                    | 6         | 0.247 ±0.001                              | 14.56 ±0.16         | 4.04 ±0.13         |

Çizelge 4. Valsli kurutucu sistem verimliliği sonuçlarına ait ANOVA analiz sonuçları

Table 4. ANOVA results of drum dryer system efficiency values

| Varyasyon Kaynağı  | Kurutma Sistemlerinde Verim Tanımlamaları |                     |                    |
|--------------------|---|---------------------|--------------------|
|                    | SMER<br>( $kg_w/kWh$ )                    | MER<br>( $kg_w/h$ ) | SEC<br>( $kJ/kg$ ) |
| Model              | < 0.0001*                                 | 0.0002*             | < 0.0001*          |
| $\beta_1$          | 0.0131*                                   | < 0.0001*           | 0.0013*            |
| $\beta_2$          | < 0.0001*                                 | 0.0053*             | < 0.0001*          |
| $\beta_1 \beta_2$  | 0.0218*                                   | 0.0086*             | 0.0017*            |
| $\beta_1^2$        | 0.2180                                    | 0.5471              | 0.7512             |
| $\beta_2^2$        | < 0.0001*                                 | 0.0016*             | 0.0009*            |
| R <sup>2</sup>     | 0.9966                                    | 0.9704              | 0.9905             |
| Adj-R <sup>2</sup> | 0.9938                                    | 0.9457              | 0.9826             |

$\beta_1$  : Buhar basıncı (bar);  $\beta_2$  : Dönme hızı (dev/dak)

$\beta_1$ : vapor pressure (bar);  $\beta_2$  : Valse rotational speed (rpm)

\*P<0.05 düzeyinde önemli

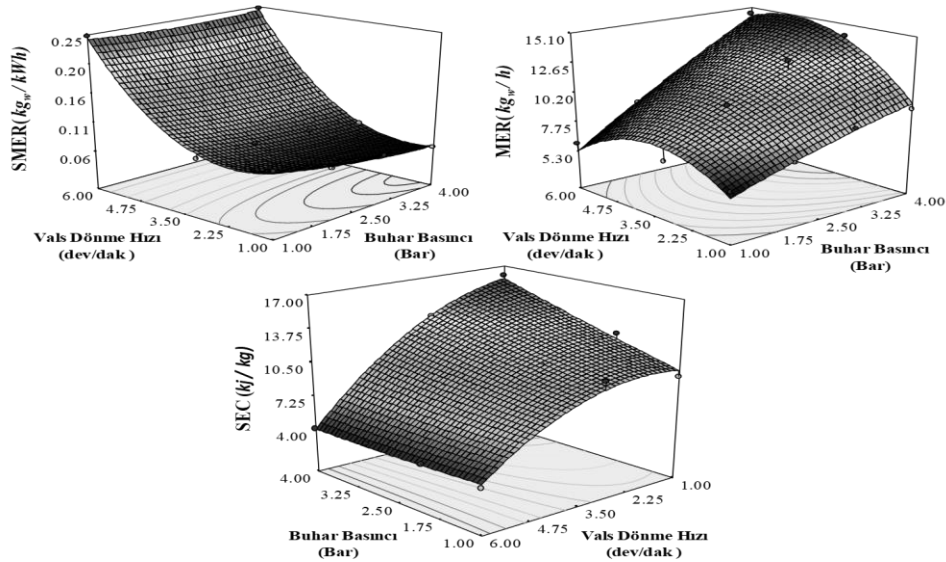
\*significant at P<0.05

Toplam endüstriyel enerji tüketiminin % 10-25'ini, gıdalarda kurutma işlemi sırasında harcanan enerji oluşturmaktadır (Eroğlu ve Yıldız, 2011). Gıdaların kurutulmasının yoğun bir enerji tüketimine yol açması; etkin enerji kullanımına sahip kurutma süreçlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir (Chua vd., 2002). Kurutucuların performansını tanımlamak ve karşılaştırmak için özgül nem alma hızı (SMER), nem alma hızı (MER) ve özgül enerji tüketimi (SEC)

tanımlamaları kullanılmaktadır (Phahom vd., 2017). Bu çalışmada da belirtilen performans göstergeleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır. SMER değerleri valsli kurutucuda gerçekleştirilen kurutma denemelerinde 0.062 ile 0.247  $kg_w/kWh$  aralığında değişim göstermektedir (Çizelge 3). Buhar basıncının artmasıyla SMER değerlerinde belirgin bir fark tespit edilmemiştir. Fakat vals dönme hızının artmasıyla SMER değerleri artış göstermektedir (Şekil 4). Düşük buhar basıncı (1

bar) uygulamalarında 3 dev/dak koşullarında gerçekleştirilen denemelerin SMER değerlerinin 1 dev/dak olan denemeden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebi; sistemde uygulanan kuruma süresinin, vals dönme hızına bağlı toplam enerji girdisine olan etkisidir. SMER değerinin maksimum değerde olması kurutucu sistemin performansının artması için istenmektedir. SMER değerinin maksimum değere ulaştığı denemeler; 1 bar, 6 dev/dak ve 4 bar, 6 dev/dak koşullarında olmuştur. Sonuçlara göre SMER değerleri açısından buhar basıncına kıyasla vals dönme hızının daha etkin bir parametre olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4,  $P<0.05$ ). Valsli kurutucuda 2-faz pirinanın ön kurutulması denemelerinde nem alma hızı (MER) değerlerinin 5.94 ile 14.56  $kg_w/h$  değerleri arasında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3). MER değerinin en düşük olduğu nokta 1 bar, 6 dev/dak koşullarında gerçekleştirilen kurutma denemesi ve en yüksek olduğu nokta ise 4 bar, 6 dev/dak koşulundaki denemedir. Buhar basıncının artmasıyla kurutma MER değerleri artış göstermektedir. Yüksek buhar basıncı (4 bar) hariç diğer buhar basıncı uygulamalarında vals dönme hızı 3 dev/dak koşuluna kadar MER değerleri artış gösterirken; 3 dev/dak koşulundan 6 dev/dak koşuluna kadar ise düşüş göstermektedir. 4 bar'da gerçekleştirilen

denemelerde ise kuruma sürelerindeki farklılıklar yüksek enerji girdisiyle birlikte; vals dönme hızının artmasıyla MER değerinin artmasına yol açmıştır (Şekil 4). Yüksek kurutucu performansı için MER değerinin maksimum değerde olması istenmektedir ve bu koşullar altında 4 bar 6 dev/dak denemesi maksimum değere sahiptir. Ayrıca valsli kurutucu bağımsız değişkenlerinden buhar basıncı ve vals dönme hızının MER değerleri üzerine istatistiksel olarak da etkisinin önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4,  $p<0.05$ ). Özgül enerji tüketimi (SEC) değerlerinin ise minimum değeri ( $4.04 kJ/kg$ ) 1 bar, 6 dev/dak ve 4 bar 6 dev/dak koşullarındaki kurutma denemelerinde ortaya çıkarken, maksimum SEC değerine ( $16.06 kJ/kg$ ) ise 4 bar, 1 dev/dak koşulundaki kurutma denemelerinde ulaşılmıştır (Çizelge 3). Yüksek enerji verimiyle valsli kurutucuda kurutma işleminin gerçekleştirilmesi için SEC değerinin minimum olması beklenmektedir. Şekil 4'de görüldüğü üzere bağımsız işlem değişkenlerinden buhar basıncının artmasıyla SEC değerinde artış; vals dönme hızının artması ise SEC değerinde bir azalışa sebep olmaktadır. Valsli kurutucu bağımsız işlem değişkenlerinin SEC değerleri üzerine etkisinin de istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür (Çizelge 4,  $P<0.05$ ).



Şekil 4. Valsli kurutucuda 2-faz pirinanın ön kurutulması aşamasında SMER, MER, SEC değerlerinin değişiminin 3 boyutlu gösterimi

Figure 4. 3D representation of the change of SMER, MER, SEC values during the pre-drying phase of 2-phase pomace in drum dryer

## SONUÇ

Bu çalışmada, Valsli kurutucu bağımsız değişkenlerinden buhar basıncı ve vals dönme hızının pirinanın kalitesi ve enerji verimliliği üzerine etkisi incelenmiştir. Yarı kurutulmuş pirinanın fiziksel ve kimyasal kalitesini belirlemek için yapılan; % titrasyon asitliği, peroksit değeri, serbest yağ asitliği ve UV ışığında özgül soğurma değerleri (K232, K270) buhar basıncının artmasıyla artmakta; vals dönme hızının arttırılması ile azalmaktadır. Yarı kurutulmuş ürünün nem içeriği, su aktivitesi ve pH değerleri ise buhar basıncının artmasıyla azalış; vals dönme hızının artması ile de artış eğilimindedir. Yüksek buhar basıncı ve düşük vals dönme hızı uygulamasının pirinada kalite kayıplarına yol açtığı belirlenmiştir. Valsli kurutucunun yüksek kurutma performansı ve enerji verimliliğini sağlayabilmesi için maksimum değerlere ulaşması istenen SMER ve MER değerleri ile minimum SEC değerlerinin deneme planına göre; yüksek barda ve yüksek devirde (4 bar, 6 devir/ dakika) gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Bu çalışma ışığında; 2-faz pirinanın ön kurutma işleminde valsli kurutucunun etkin bir şekilde kullanılabilir olduğu görülmektedir. Pirina kurutmak için kullanılan hali hazırdaki kurutucu sistemlerde 2-faz pirina yüksek şeker ve nem içeriğinden dolayı direkt olarak kurutulmamaktadır. 2-faz pirinanın kurutma sorunlarını ortadan kaldırmak için ön kurutma işleminin uygulanması büyük önem arz etmektedir. Gıda kurutma çalışmalarında da gıdaların kalitesinin incelenmesinin yanı sıra kurutucu sistemlerin enerji verimliliklerinin incelenmesinin gerekliliği de bu çalışma ile ortaya konmuştur. 2-fazlı pirinanın değerlendirilmesinde ön kurutma işleminin etkin bir şekilde sağlanması ile birlikte ön kurutulmuş pirinanın; hayvan yemi katkı maddesi, bahçe bitkilerinin yetiştirilmesi, toprağın güçlendirilmesinde gübre gibi alanlarda kullanımının araştırılması ve yaygınlaştırılması büyük önem taşımaktadır.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## YAZARLARIN KATKISI

Bu çalışmada Ulaş BAYSAN, çalışmada gerçekleştirilen üretim, analizler, sonuçların düzenlenerek yorumlanması ve makalenin yazımında görev almıştır. Ali GÜNGÖR çalışmanın kurgulanması ve sonuçların yorumlanmasında katkıda bulunmuşlardır. Mehmet KOÇ ve Figen KAYMAK-ERTEKİN, çalışmanın planlanması ve yürütülmesi süreci ile sonuçların değerlendirilmesi ve makalenin yazımında katkıda bulunmuşlardır.

**Teşekkür:** Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (proje numarası 16-MUH-024).

## KAYNAKLAR

- Arjona, R., Ollero, P. (2005). Automation of an olive waste industrial rotary dryer. *Journal of Food Engineering* 68(2): 239–247, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.049>.
- Arslan, E. E., Karademir, G., Berktaş, S., Çam, M. (2021). Zeytin yaprağı ekstraktı içeren soğuk çay üretimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi* 9(3): 843-849, DOI: 10.21923/jesd.904344.
- AOAC. (1980). Official Methods of Analysis, AOAC INTERNATIONAL. 13th Edition, Washington DC, the USA.
- AOAC. (1990). Official Methods for Analysis, AOAC INTERNATIONAL. 15th Edition, Washington DC, the USA.
- Bensmira, M., Jiang, B., Nsabimana, C., Jian, T. (2007). Effect of lavender and thyme incorporation in sunflower seed oil on its resistance to frying temperatures. *Food Research International* 40(3): 341–346, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.10.004>.
- Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., Hrnčić, M. K. (2020). Microbiological and antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *Molecules* 25(24): 5946, doi: 10.3390/molecules25245946.
- Cemeroğlu, B., 2007. *Gıda Analizleri*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, Türkiye, 535 s.
- Chua, K.J., Chou, S.K., Ho, J.C., Hawlader, M.N.A. (2002). Heat pump drying: recent

- developments and future trends. *Drying Technology* 20(8):1579-1610, DOI: 10.1081/DRT-120014053.
- Çelen, S., Aktaş, T., Karabeyoğlu, S.S., Akyıldız, A. (2015). Zeytin Pirinasının Mikrodalga Enerjisi Kullanılarak Kurutulması ve Uygun İnce Tabaka Modelinin Belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 12(2): 21-31.
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry* 48(10):1532-1552, DOI: 10.1016/j.procbio.2013.07.010.
- Erbay, B., Küçükşayan, S., Küçüköner, E. (2010). Renklendirilmiş Fermente “Memecik” Çeşidi Zeytinlerin Fiziksel, Kimyasal ve Duyusal Özellikleri. *Akademik Gıda* 8(6):13-18.
- Eroğlu, E., Yıldız, H. (2011). Gıdaların ozmotik kurutulmasında uygulanan yeni tekniklerin enerji verimliliği bakımından değerlendirilmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 6(2): 41-48.
- Göğüş, F., Özkaya, M., Ötleş, S. (2009). Zeytinyağı. Eflatun Yayınevi, Ankara, Türkiye.
- Gürlek, G., Akdemir, Ö., Güngör, A. (2015). Gıda Kurutulmasında Isı Pompalı Kurutucuların Kullanımı ve Elma Kurutmada Uygulanması. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* 21: 398-403, doi: 10.5505/pajes.2015.35761.
- Hawladar, M.N.A., Jahangeer, K.A. (2006). Solar heat pump drying and water heating in the tropics. *Solar Energy* 80(5): 492-499, https://doi.org/10.1016/j.solener.2005.04.012.
- Hernández, V., Romero-García, J.M., Dávila, J.A., Castro, E., Cardona, C.A. (2014). Techno-economic and environmental assessment of an olive stone based biorefinery. *Resources, Conservation and Recycling* 92: 145-150, https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2014.09.008
- Kaya, S., Demir, N. (2020). Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ekstraktının model organizma *Galleria mellonella* hemosit aracılı bağışıklık tepkileri üzerine etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 7(3): 646-653, https://doi.org/10.30910/turkjans.691138.
- Kılıç, S. (2020). Kazdağları bölgesine ait zeytin, zeytin yaprağı ve zeytinyağlarının element tayini ve metot validasyonu. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences* 3(1): 48-54, https://doi.org/10.46239/ejbcsc.739834.
- Kıvrak, M., Yorulmaz, A., Erinç, H. (2016). Ak Delice Yabani Zeytini (*Olea Europal L. Subsp. Oleaster*) ve Zeytinyağının Karakterizasyonu. *GIDA* 41(5): 367-372, doi: 10.15237/gida.GD16038.
- Köseoğlu, O. (2006). Zeytinden Yağ Elde Etme Sistemlerinin Zeytinyağının Kalitesi ile Açılığı Üzerine Etkileri (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye.
- Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., de Torres, A., Romero, I., Castro, E. (2019). Extraction of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside from olive leaves: Optimization of technique and operating conditions. *Food Chemistry*, 293(30): 161-168, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.075.
- Milczarek, R.R., Dai, A.A., Otoni, C.G., McHugh, T.H. (2011). Effect of shrinkage on isothermal drying behavior of 2-phase olive mill waste. *Journal of Food Engineering* 103(4): 434-441, https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.013.
- Minkova, V., Razvigorova, M., Bjornbom, E., Zanzi, R., Budinova, T., Petrov, N. (2001). Effect of water vapour and biomass nature on the yield and quality of the pyrolysis products from biomass. *Fuel Processing Technology* 70(1): 53-61, https://doi.org/10.1016/S0378-3820(00)00153-3.
- Moral, P.S., Méndez, M.V.R. (2006). Production of pomace olive oil. *Grasas Aceites* 57(1): 47-55, ISSN: 0017-3495.
- Paredes, C., Bernal, M.P., Roig, A., Cegarra, J. (2001). Effects of olive mill wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes. *Biodegradation* 12: 225-234, DOI:10.1023/A:101737442156.
- Phahom, T., Phoungchandang, S., Kerr, W.L. (2017). Effects of steam-microwave blanching

and different drying processes on drying characteristics and quality attributes of *Thunbergia laurifolia* Linn. leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97(10): 3211-3219, doi: 10.1002/jsfa.8167.

Ranalli, A., Martinelli, N. (1995). Integral centrifuges for olive oil extraction, at the third millenium threshold. Transformation yields. *Grasas y Aceites* 46: 255–263.

Sadi, T., Meziane, S. (2015). Mathematical modelling, moisture diffusion and specific energy consumption of thin layer microwave drying of olive pomace. *International Food Research Journal* 22(2):494-501,

Salık, M. A., Çakmakçı, S. (2021). Zeytin (*Olea Europaea* L.) yaprağının fonksiyonel özellikleri ve gıdalarda kullanım potansiyeli. *Gıda* 46(6): 1481-1493, doi.org/10.15237/gida.GD21133.

Seçkin, G.U., Taşeri, L. (2015). Yarı-kurutulmuş meyve ve sebzeler. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* 21(9): 414-420, doi: 10.5505/pajes.2015.47560.

Sun-Waterhouse, D., Zhou, J., Miskelly, G.M., Wibisono, R., Wadhwa, S.S. (2011). Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. *Food Chemistry* 126 (3): 1049–1056, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.124.

Temur, A., Temiz, M. A. (2018). Zeytin yaprağının (*Olea europaea* L.) diyabetik sıçanlarda bazı biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerine etkisi. *Alinteri Journal Of Agriculture Science*, 33(1): 13-19, https://doi.org/10.28955/alinterizbd.341465

TGK. (2014). Türk Gıda Kodeksi ve Prina Yağı Numune Alma ve Analiz Metotları Tebliği.

Torrecilla, J.S., Aragón, J.M., Palancar, M.C. (2005). Modeling the drying of a high-moisture solid with an artificial neural network. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44: 8057–8066, DOI: 10.1021/ie0490435

Vural, N., Cavuldak, Ö. A., Akay, M. A. (2021). D-Optimal design and multi-objective optimization for green extraction conditions developed with ultrasonic probe for oleuropein. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 20:100279, https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2020.100279.

Zungur, A., Koç, M., Yalçın, B., Kaymak-Ertekin, F., Ötleş, S. (2014). Storage stability of microencapsulated extra virgin olive oil powder, in: 9th Baltic Conference on Food Science and Technology “Food for Consumer Well-Being.” p. 257.

## YEŞİL SEBZELERDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ VE KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ENTEROBACTERALES* SUŞLARININ ARAŞTIRILMASI

Vasfi Mehmet Balki<sup>1</sup>, Nükhet Nilüfer Demirel Zorba<sup>1</sup>, Nesrin Çakıcı<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü. Çanakkale, Türkiye

<sup>2</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu. Çanakkale, Türkiye

Geliş/Received: 18.11.2022; Kabul /Accepted: 07.04.2023; Online baskı /Published online: 10.05.2023

Balki, V. M., Demirel Zorba, N. N., Çakıcı, N. (2023). Yeşil sebzelerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz üreten *Enterobacteriales* suşlarının araştırılması. GIDA (2023) 48 (3) 575-586 doi: 10.15237/gida.GD22112

Balki, V. M., Demirel Zorba, N. N., Çakıcı, N. (2023). Investigation of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing *Enterobacteriales* strains in green vegetables. GIDA (2023) 48 (3) 575-586 doi: 10.15237/gida.GD22112

### ÖZ

Çanakkale semt pazarlarında satılan 96 adet yeşil sebze örneğinde beta-laktam dirençli *Enterobacteriales* suşlarının varlığı araştırılmıştır. Gövde, yaprak kısımlarından alınan örneklerden Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agara ekilmiştir. *Enterobacteriales* yükleri <1 log KOB/g ile 6.11 log KOB/g arasında tespit edilmiştir. Kromojenik GSBL Agar ve 2 mg/ml meropenem içeren EMB Agarda üreyen 129 adet izolat MALDI-TOF MS yöntemine göre *Serratia liquefaciens* (n=35), *Serratia phymuthica* (n=31), *Klebsiella oxytoca* (n=25), *Klebsiella pneumonia* (n=6), *Raoultella ornithinolytica* (n=14), *Raoultella terrigena* (n=3), *Enterobacter cloacae* (n=11), *Enterobacter ludwigii* (n=4), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Lelliottia amnigena* (n=16), *Escherichia coli* (n=2), *Escherichia hermannii* (n=1), *Leclercia adecarboxylata* (n=3), *Pantoea agglomerans* (n=3), *Kluyvera intermedia* (n=2), *Kosakonia cowanii* (n=1) ve *Hafnia alvei* (n=1) olarak tanımlanmıştır. Disk difüzyon yöntemine göre izolatların %11.62'sinin (n=15) Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL), %4.65'inin (n=6) karbapenemaz pozitif olduğu belirlenmiştir. Yeşil sebzelerde GSBL ve karbapenem dirençli izolatların varlığı ısıtma işlemi görmeden tüketilen bu gıdalardaki halk sağlığı riskini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** *Enterobacteriales*, GSBL, karbapenemaz, antimikrobiyal direnç

## INVESTIGATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE AND CARBAPENEMASE PRODUCING *ENTEROBACTERIALES* STRAINS IN GREEN VEGETABLES

### ABSTRACT

The presence of beta-lactam resistant *Enterobacteriales* strains was investigated in 96 green vegetable samples sold in Çanakkale neighborhood markets. Samples taken from stem and leaf parts were inoculated in Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar. Enterobacteriales loads were determined between <1 log CFU/g and 6.11 log CFU/g. One hundred twenty-nine isolates grown on EMB Agar containing 2 mg/ml meropenem and chromogenic ESBL Agar were identified as, *Serratia liquefaciens*

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: ncakici@comu.edu.tr

☎:(+90) 286 218 0018

Vasfi Mehmet Balki; ORCID no: 0000-0002-3196-3016

Nükhet Nilüfer Demirel Zorba; ORCID no: 0000-0001-6851-6474

Nesrin Çakıcı; ORCID no: 0000-0001-8662-7215



( $n=35$ ), *Serratia plymuthica* ( $n=31$ ), *Klebsiella oxytoca* ( $n=25$ ), *Klebsiella pneumonia* ( $n=6$ ), *Raoultella ornithinolytica* ( $n=14$ ), *Raoultella terrigena* ( $n=3$ ), *Enterobacter cloacae* ( $n=11$ ), *Enterobacter ludwigii* ( $n=4$ ), *Enterobacter asburiae* ( $n=1$ ), *Lelliottia amnigena* ( $n=16$ ), *Escherichia coli* ( $n=2$ ), *Escherichia hermannii* ( $n=1$ ), *Leclercia adecarboxylata* ( $n=3$ ), *Pantoea agglomerans* ( $n=3$ ), *Kluyvera intermedia* ( $n=2$ ), *Kosakonia cowanii* ( $n=1$ ) and *Hafnia alvei* ( $n=1$ ) with MALDI-TOF MS method. According to the disk diffusion method, 11.62% ( $n=15$ ) of the isolates were found to be Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and 4.65% ( $n=6$ ) carbapenemase positive. ESBL and carbapenem-resistant isolates in green vegetables reveal the public health risk in these foods consumed without heat treatment.

**Keywords:** *Enterobacteriales*, ESBL, carbapenemase, antimicrobial resistance

## GİRİŞ

Gram negatif bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan en geniş antibiyotik grubu beta-laktamlardır. Bu antibiyotiklerin gittikçe artan kullanımı, bakterilerin direnç geliştirmesine ve bu antibiyotiklerin etkilerinin azalmasına neden olmuştur. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmasının temeli, beta-laktamaz enzimleridir (Poirel vd., 1999). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) Gram negatif bakterilerde sefalosporinlere dirençte öne çıkan bir mekanizma olmuş ve klinikte önemli bir sorun haline gelmiştir. GSBL'ler içerisinde en önemli grup CTX-M enzimleridir. Bu grubu, SHV ve TEM-türevi GSBL'ler izlemektedir. Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon ve integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilmektedir. (Canton vd., 2008). *Enterobacteriaceae* türleri arasında GSBL üretiminin hızı tüm dünyada hızla artmaktadır. GSBL direnci taşıyan türlerin başında *Klebsiella pneumonia* ve *Escherichia coli* gelmektedir.

Karbapenemler beta-laktam sınıfı içerisinde en geniş spektruma sahip, hızlı bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir (Budak vd., 2012). Karbapenemleri hidrolize eden karbapenemazlar, neredeyse tüm beta-laktamları hidrolize edebilen en güçlü beta-laktamazlar olup bu enzimin *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri arasında dünya çapındaki artışı endişe yaratmaktadır. Karbapenemaz üretimi en sık *K. pneumoniae*'de görülmekle birlikte *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, ve diğer *Enterobacteriales* üyelerinde de saptanabilmektedir (Nordmann ve Poirel, 2002).

Taze sebzeler tarladan sofraya kadar pek çok noktada mikroorganizmalar ile temas etmektedir (Taormina ve Beuchat, 1999). Sebzelerin

kontaminasyonu yetiştirme, hasat, ayırma ve dağıtım sırasında meydana gelebilmektedir. *Enterobacteriales* türleri içerisinde insan ve hayvanların bağırsaklarında doğal konak olarak ifade edilen bazı türler de mevcuttur. Bu bakterilerin atıksu yoluyla ve fekal kontaminasyon sonucu yayılabileceğini bildirilmiştir (Bain vd., 2014). Sulama suyu taze sebzelerin bakteriyel kontaminasyonunda ana etken olarak belirlenmiştir. Taze sebzelerin içerdiği besin öğelerinden daha fazla yararlanmak için genellikle çiğ tüketilmeleri birçok mikroorganizmanın da sindirim sistemine girişine olanak sağlamaktadır (Franz vd., 2008; Van Hoek vd., 2015).

Günümüzde gıda kaynaklı mikroorganizmalar aracılığı ile antibiyotik direnç yayılımı ciddi bir halk sağlığı riski oluşturmaktadır. Yapılan çalışmaların birçoğu hayvansal gıdalardan izole edilen mikroorganizmalar ile ilgili olsa da çiğ tüketilen sebze ve meyvelerin de bu konuda risk teşkil ettiği bildirilmektedir (Ayhan vd., 2020; Kısa ve Tuncer, 2021). Antibiyotiklerin hayvanlara profilaktik, kemoteröpatik ve büyümeyi teşvik gibi amaçlar için kullanıldığı bilinmektedir (Demirer ve Özdemir 2021). Gübre olarak hayvan dışıklarının kullanılıyor olması da antibiyotik dirençli bakterilerin ve antibiyotik kalıntılarının sebze ve meyvelere geçmesine neden olabilmektedir (Tien vd., 2017; Hudson vd., 2017). Özellikle taze tüketilen yeşil sebzelerde antibiyotik dirençli bakterilerin varlığı halk sağlığı açısından önem taşımaktadır (Wadamori vd., 2017; de Oliveira Elias vd; 2018; Saksena vd., 2020).

Çiğ tüketilen sebzelerde GSBL ve Karbapenem dirençli bakteri prevalansı ile ilgili çalışmalara rastlanmakla birlikte, ülkemiz verilerinin bu konuda kısıtlı kaldığı görülmektedir. Antibiyotik

dirençli bakterilerin yayılımının izlenmesine katkı sağlayacağı düşünülen bu çalışmada; Çanakkale’de tüketilen yeşil sebzelerdeki *Enterobacterales* türlerinin ve beta-laktam antibiyotiklere dirençlilik durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

### MATERYAL VE YÖNTEM

Çanakkale merkez ve bazı ilçelerinde kurulan semt pazarlarından temin edilen dereotu ( $n=10$ ), marul ( $n=10$ ), roka ( $n=15$ ), maydanoz ( $n=13$ ), yeşil soğan ( $n=8$ ), ıspanak ( $n=8$ ), brokoli ( $n=8$ ), pırasa ( $n=6$ ), nane ( $n=5$ ), semizotu ( $n=7$ ), tere ( $n=4$ ) ve kuzukulağından ( $n=2$ ) oluşan toplam 96 adet sebze örneği incelemeye alınmıştır.

### Sebzelerde *Enterobacterales* yükünün saptanması

Gövde ve yaprak kısımlarından alınan 25 gram örnek 225 mL tamponlanmış peptonlu su ile 2 dakika stomacher cihazında homojenize edilmiştir. Homojenizattan Maksimum Recovery Broth (MRB) kullanılarak seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Yayma plak yöntemine göre Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Merck) besiyerlerine aktarılarak ekim yapılmıştır. Petriler 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra 30-300 arasında üreme gösteren petriler dikkate alınarak muhtemel *Enterobacterales* türlerine ait bakterilerin sayıları saptanmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 2015).

### İzolatların tanımlaması

Yeşil sebze örneklerinden izole edilen izolatlara gram boyama, oksidaz, katalaz, IMVIC (İndol, Metil red, Voges proskauer, Sitrata), Triple Sugar Iron Agarda (TSI) karbonhidrat fermentasyonu ve H<sub>2</sub>S testleri uygulanmıştır. İzolatlar %20 lik gliserollü buyyon içerisinde -20 °C saklanmıştır. Aynı izolatlar MALDI-TOF MS (Bruker Microflex LT, Almanya) ile Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarında tanımlanmıştır. Tanımlamada Flex Control 3.0 yazılımı kullanılmıştır. Örneklerin hazırlanmasında direkt transfer metodu kullanılmıştır. 24-48 saatlik inkübasyon sonunda tek koloniden küçük bir miktar kürdan ile plakaya sürülmüş ve üzerine 1 µl matriks (50% asetonitril varlığında 12.5 mg/ml α-cyano-4-hydroxycinnamic asit ve %2.5

trifloraasetik asit karışımı) solüsyonu eklenmiştir. Sistemle çalışırken, lineer pozitif iyon modunda 2000-20.000 Da kütle aralığında, mikroorganizma tanımlama için optimize edilmiş uygun yöntem ile çift ölçümler gerçekleştirilmiştir. İyon kaynağı olarak 340 nm’de 60 Hz nitrojen lazer kullanılmıştır. Spektrumları elde etmek için her örneğin ölçümünde toplamda 240 olacak şekilde 40’arlık paketten oluşan lazer darbeleri uygulanmıştır (Cheng vd. 2016., Encu vd. 2022., Fırıncioğulları vd. 2022).

### GSBL tarama testi

*Enterobacterales* izolatları ESBL kromojenik besiyerinde (Hichrome, İngiltere) ve 2mg/ml meropenem içeren Eosin Metilen Blue Agar (EMB, Merck, Almanya) besiyerine çizilerek muhtemel Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ve karbapenemaz üretici olanlar belirlenmiştir.

Antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile yapılmıştır. Nutrient Agar besiyerine (Merck, Almanya) tek düşürme tekniğine göre ekim yapılan kültürler 37°C de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İzolatların disk difüzyon yöntemi ile sefotaksim (5 µg) ve seftazidim (10 µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST, 2022) önerileri doğrultusunda analiz edilmiştir. İnhibisyon zon çapı sefotaksim için 21mm, seftazidim için 22 mm’den küçük olması durumunda fenotipik doğrulama testi yapılmıştır. Kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanılmıştır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarından temin edilmiştir).

GSBL doğrulaması için kombine disk difüzyon testi ve çift disk sinerji testi uygulanmıştır. Sefotaksim ve seftazidim disklerinden birine veya her ikisine birden dirençli olan bakterilerin sefotaksim/klavulanik asit, seftazidim/klavulanik ve sefepim/klavulanik asit disklerine karşı duyarlılıkları incelenmiştir (EUCAST, 2022).

### Karbapenemaz tarama testi

İzolatların disk difüzyon yöntemi ile meropenem (10 µg), ertapenem (10µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıklarına bakılmıştır. İnhibisyon zon çapı meropenem için 22 mm, ertapenem için 25

mm'den küçük olması dirençli olarak değerlendirilmiş ve fenotipik doğrulama testi yapılmıştır (EUCAST. 2022). Kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25922 (karbapenem negatif) ve *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (Karbapenem pozitif) kullanılmıştır (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı).

### Karbapenemaz doğrulama testi

Karbapenemaz (KPC) varlığının doğrulanmasında EUCAST 2022 kriterlerine göre kombine disk yöntemi kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı gösteren izolatlar PBA (Sigma) ve APBA (Sigma) kullanılarak kombine diskler hazırlanmış ve KPC varlığı araştırılmıştır. Meropenem 10 µg, meropenem+APBA ve meropenem+PBA ile disk difüzyon testi yapılmıştır (Giske vd. 2011; Coudron vd., 2005). KPC pozitif kontrol suşu olarak *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, KPC negatif kontrol suşu olarak da *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

### İstatistiksel analizler

Sebzelerde tespit edilen *Enterobacterales* yükü verilerinin tanımlayıcı istatistikleri (Minimum, Maksimum ortalama ve standart sapma değerlerinin hesaplanması), Minitab programı 2017 sürümü ile belirlenmiştir.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

Yeşil sebze örneklerinden izole edilen Gram negatif basil, oksidaz negatif, katalaz pozitif izolatlar önce fenotipik testlerle ardından MALDI-TOF MS yöntemine göre tanımlanmıştır. İncelemeye alınan sebze örneklerinin *Enterobacterales* yükleri <1 log KOB/g ile 6.11 log KOB/g arasında tespit edilmiştir. En yüksek *Enterobacterales* yükünün dereotunda olduğu belirlenmiş (6.11 log KOB/g), onu roka ile maydanoz (5.98 log KOB/g) izlemiştir (Çizelge 1).

VRBG Agarda izole edildikten sonra saflaştırılan, 2mg/ml meropenem içeren EMB ve Kromojenik ESBL Agarda üreyen toplam 129 adet izolat incelemeye alınmıştır. Bu izolatlar sebze türlerine göre sırasıyla; maydanozdan 33, rokadan 32, maruldan 27, ıspanaktan 14, yeşil soğandan 8,

semiz otundan 4, brokoli ve naneden 3, pırasadan 2, tere, kuzukulağı ve dereotundan 1'er izolat olmak üzere dağılım göstermiştir. Sebzelerden izole edilen *Enterobacterales* üyesi bakterilerin dağılımı Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Elde edilen 129 izolat MALDI-TOF MS yöntemine göre; *Serratia liquefaciens* (n=35), *Serratia plymuthica* (n=31), *Klebsiella oxytoca* (n=25), *Klebsiella pneumoniae* (n=6), *Raoultella ornithinolytica* (n=14), *Raoultella terrigena* (n=3), *Enterobacter cloacae* (n=11), *Enterobacter ludwigii* (n=4), *Enterobacter asburiae* (n=1), *Lelliottia amnigena* (n=16), *Escherichia coli* (n=2), *Escherichia hermannii* (n=1), *Leclercia adecarboxylata* (n=3), *Pantoea agglomerans* (n=3), *Kluyvera intermedia* (n=2), *Kosakonia cowanii* (n=1) ve *Hafnia alvei* (n=1) olarak tanımlanmıştır. MALDI-TOF MS yöntemine göre *Enterobacterales* türlerinin dağılımı ve skor aralıkları Çizelge 3'te gösterilmiştir.

Sebzelerden izole edilen 129 izolattan 13'ünün sefotaksime, 71'inin seftazidime, 7 adet izolatın meropeneme dirençli ve 42 adet izolatın ertapeneme dirençli olduğu belirlenmiştir. Dört çeşit antibiyotige (CTX, SFZ, MRP, ERT) aynı anda direnç gösteren izolat sayısının ise 5 adet olduğu belirlenmiştir. İncelen 55 adet izolatın hiçbir antibiyotige direnç göstermediği ve 74 adet izolatın en az bir antibiyotige direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Buna göre, elde edilen izolatlardan 15 adedi (% 11.62) GSBL pozitif bulunurken 6 adedi (% 4.65) karbapenemaz pozitif bulunmuştur. GSBL fenotipik doğrulama testleri sonuçlarına göre farklı sebzelerden elde edilen *Klebsiella oxytoca* (n=5), *Klebsiella pneumoniae* (n=2), *Enterobacter ludwigii* (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=1), *Raoultella terrigena* (n=2), *Raoultella ornithinolytica* (n=1), *Hafnia alvei* (n=1) ve *Pantoea agglomerans* (n=1) üzere toplam 15 (% 11.6) izolatın GSBL üreticisi olduğu fenotipik doğrulama testi ile doğrulanmıştır. Sebzelerden izole edilen GSBL pozitif *Enterobacterales* türleri Çizelge 4'te verilmiştir. Karbapenemaz doğrulama testi sonuçlarına göre 2 adet *Enterobacter* spp., 1 adet *Klebsiella* spp. ile 1 adet *Pantoea* spp.'nin MBL+KPC üreticisi, 2 adet *Enterobacter* spp.'nin KPC üreticisi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 1. Sebze örneklerinin *Enterobacterales* yükleri.  
 Table 1. *Enterobacterales* counts of the vegetable samples.

| Sebze örnekleri (n)<br><i>Vegetable samples (n)</i> | <i>Enterobacterales</i> yükü<br>log kob/g<br><i>Number of Enterobacterales</i><br>log kob/g |  |                            |
|---|---|--|----------------------------|
|   | Minimum<br><i>Minimum</i>   | Ortalama ± standart<br>sapma<br><i>Mean ± standard</i><br><i>deviation</i> | Maksimum<br><i>Maximum</i> |
| Dereotu<br><i>Dill (10)</i>                         | <1  | 2.84±2.60  | 6.11                       |
| Marul<br><i>Lettuce (10)</i>                        | <1  | 3.90± 2,19   | 5.93                       |
| Roka<br><i>Rocket (15)</i>                          | <1  | 4.71±1.40  | 5.98                       |
| Maydanoz<br><i>Parsley (13)</i>                     | 2.78  | 4.85±0.99  | 5.98                       |
| Yeşil soğan<br><i>Scallion (8)</i>                  | <1  | 3.97±2.47  | 5.82                       |
| Ispanak<br><i>Spinach (8)</i>                       | 4.59  | 5.06±0.33  | 5.43                       |
| Brokoli<br><i>Broccoli (8)</i>                      | <1  | 0.50±1.40  | 3.94                       |
| Pırasa<br><i>Leek (6)</i>                           | <1  | 3.16±2.46  | 5.08                       |
| Nane<br><i>Mint (5)</i>                             | <1  | 1.97±2.70  | 5.04                       |
| Semizotu<br><i>Purslane (7)</i>                     | <1  | 2.30±2.30  | 5.18                       |
| Tere<br><i>Cress (4)</i>                            | <1  | 1.79±2.07  | 3.66                       |
| Kuzukulağı<br><i>Sorrel (2)</i>                     | 3.32  | 3.95±0.89  | 4.58                       |

Çizelge 2. Sebze türlerine göre *Enterobacteriales* üyesi bakterilerin dağılımı.Table 2. *Distribution of Enterobacteriales member bacteria by vegetable species*

| Sebzeler<br><i>Vegetable (n)</i>   | <i>Serratia</i> spp. | <i>Klebsiella</i> spp. | <i>Raoultella</i> spp. | <i>Enterobacter</i> spp. | <i>Lelliottia</i> spp. | <i>Escherichia</i> spp. | <i>Leclergia</i> spp. | <i>Pantaoea</i> spp. | <i>Klugera</i> spp. | <i>Hafnia</i> spp. | <i>Kosakonia</i> spp. | İzolasyon sayısı (n)<br><i>Number of isolates(n)</i> |
|------------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|--|
| Maydanoz<br><i>Parsley</i> (13)    | 14                   | 4                      | 6                      | -                        | 3                      | 2                       | -                     | 2                    | 2                   | -                  | -                     | 33   |
| Roka<br><i>Rocket</i> (15)         | 8                    | 11                     | 6                      | 3                        | 1                      | 1                       | -                     | -                    | -                   | 1                  | 1                     | 32   |
| Marul<br><i>Lettuce</i> (10)       | 10                   | 3                      | -                      | 3                        | 11                     | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 27   |
| Ispanak<br><i>Spinach</i> (8)      | -                    | 4                      | 2                      | 4                        | -                      | -                       | 3                     | 1                    | -                   | -                  | -                     | 14   |
| Yeşil soğan<br><i>Scallion</i> (8) | -                    | 4                      | 2                      | 2                        | -                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 8  |
| Semizotu<br><i>Purslane</i> (7)    | -                    | -                      | -                      | 4                        | -                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 4  |
| Brokoli<br><i>Broccoli</i> (8)     | 1                    | 1                      | 1                      | -                        | -                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 3  |
| Nane<br><i>Mint</i> (5)            | -                    | 2                      | -                      | -                        | 1                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 3  |
| Pırasa<br><i>Leek</i> (6)          | -                    | 2                      | -                      | -                        | -                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 2  |
| Tere<br><i>Cress</i> (4)           | 1                    | -                      | -                      | -                        | -                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 1  |
| Kuzukulağı<br><i>Sorrel</i> (2)    | 1                    | -                      | -                      | -                        | -                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 1  |
| Dereotu<br><i>Dill</i> (10)        | 1                    | -                      | -                      | -                        | -                      | -                       | -                     | -                    | -                   | -                  | -                     | 1  |
| Toplam<br><i>Total</i> (96)        | 36                   | 31                     | 17                     | 16                       | 16                     | 3                       | 3                     | 3                    | 2                   | 1                  | 1                     | 129  |

Çizelge 3. *Enterobacterales* türlerinin MALDI -TOF skor aralıkları.Table 3. MALDI-TOF score ranges of *Enterobacterales* species

| Bakteri<br><i>Bacterium</i>       | İzolat sayısı<br>(n)<br><i>Number of isolates(n)</i> | Skor Değeri<br>(Min- Maks)<br><i>Score Value<br/>(Min-Max)</i> |
|-----------------------------------|--|--|
| <i>Serratia liquefaciens</i>      | 35   | 1.692 - 2.369  |
| <i>Serratia phymuthica</i>        | 1  | 2.16   |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>         | 25   | 1.552 - 2.325  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>      | 6  | 1.702 - 2.265  |
| <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 14   | 1.778 - 2.364  |
| <i>Raoultella terrigena</i>       | 3  | 1.853 - 2.111  |
| <i>Enterobacter cloacae</i>       | 11   | 1.678 - 2.287  |
| <i>Enterobacter ludwigii</i>      | 4  | 1.784 - 2.205  |
| <i>Enterobacter asburiae</i>      | 1  | 2  |
| <i>Lelliottia amnigena</i>        | 16   | 1.99 - 2.478   |
| <i>Escherichia coli</i>           | 2  | 2.247 - 2.327  |
| <i>Escherichia hermannii</i>      | 1  | 2.067  |
| <i>Leclercia adecarboxylata</i>   | 3  | 2.076 - 2.407  |
| <i>Pantoea agglomerans</i>        | 3  | 1.935 - 2.123  |
| <i>Kluyvera intermedia</i>        | 2  | 2.122 - 2.282  |
| <i>Hafnia alvei</i>               | 1  | 1.648  |
| <i>Kosakonia cowanii</i>          | 1  | 1.804  |
| Toplam                            | 129  | 1.552 -2.478   |
| Total                             |  |  |

Çizelge 4. Sebzelerden izole edilen GSBL pozitif *Enterobacterales* türleri.Table 4. ESBL positive *Enterobacterales* strains isolated from vegetables

| Sebze<br><i>Vegetable</i>  | <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>(n/%) | <i>Klebsiella oxytoca</i><br>(n/%) | <i>Enterobacter ludwigii</i><br>(n/%) | <i>Enterobacter cloacae</i><br>(n/%) | <i>Raoultella terrigena</i><br>(n/%) | <i>Raoultella ornithinolytica</i><br>(n/%) | <i>Hafnia alvei</i> (n/%) | <i>Pantoea agglomerans</i><br>(n/%) | GSBL (+)<br>(n/%) |
|----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------|-------------------------------------|-------------------|
| Marul<br><i>Lettuce</i>    | 1 (6.6)                               | -                                  | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                         | -                                   | 1 (6.6)           |
| Roka<br><i>Rocket</i>      | -                                     | 3 (20)                             | 2 (13.3)                              | -                                    | 2 (13.3)                             | -  | 1 (6.6)                   | -                                   | 8(53.3)           |
| Maydanoz<br><i>Parsley</i> | -                                     | -                                  | -                                     | -                                    | -                                    | 1 (6.6)                                    | -                         | 1 (6.6)                             | 2 (13.3)          |
| Ispanak<br><i>Spinach</i>  | 1 (6.6)                               | -                                  | -                                     | 1 (6.6)                              | -                                    | -  | -                         | -                                   | 2 (13.3)          |
| Nane<br><i>Mint</i>        | -                                     | 2 (13.3)                           | -                                     | -                                    | -                                    | -  | -                         | -                                   | 2 (13.3)          |
| Toplam                     | 2(13.3)                               | 5(33.3)                            | 2 (13.3)                              | 1 (6.6)                              | 2(13.3)                              | 1 (6.6)                                    | 1 (6.6)                   | 1 (6.6)                             | 15(100)           |
| Total                      |                                       |                                    |                                       |                                      |                                      |  |                           |                                     |                   |

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

ESBL: Extended Spectrum Beta-Lactamase

Çizelge 5. Sebzelerden izole edilen karbapenemaz pozitif *Enterobacterales* türleri.  
Table 5. Carbapenemase positive *Enterobacterales* strains isolated from vegetables.

| Sebze<br><i>Vegetable</i>      | Bakteri<br><i>Bacterium</i>  | Metallo Beta-Laktamaz<br><i>Metallo Beta-Lactamase</i> | Karbapenemaz<br><i>Carbapenemase</i> |
|--------------------------------|------------------------------|--|--------------------------------------|
| Marul<br><i>Lettuce</i>        | <i>Enterobacter cloacae</i>  | +  | +                                    |
| Roka<br><i>Rocket</i>          | <i>Klebsiella oxytoca</i>    | +  | +                                    |
| Maydonoz<br><i>Parsley</i>     | <i>Pantoea agglomerans</i>   | +  | +                                    |
| Yeşil soğan<br><i>Scallion</i> | <i>Enterobacter ludwigii</i> | +  | +                                    |
| Ispanak<br><i>Spinach</i>      | <i>Enterobacter cloacae</i>  | -  | +                                    |
| Semizotu<br><i>Purslane</i>    | <i>Enterobacter cloacae</i>  | -  | +                                    |

Tarımda kullanılan hayvan gübreleri gıda kaynaklı patojenler için önemli bir risk faktörüdür. Yapılan çalışmalar bağırsak kaynaklı insan ve hayvan patojenlerinin gübrede ve gübre ile karıştırılmış toprakta uzun süre canlı kalabildiğini göstermektedir (Jiang ve Shepherd, 2009; Szczech vd., 2018). Sebzeler sulama suyuna karışan gübre, kanalizasyon vb. kirlilik kaynaklarıyla doğrudan temas yolu ile kontamine olabilmektedir. İspanya'da, sebzelerde *Enterobacterales* taraması yapılan bir çalışmada *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *S. rubidaea*, *E. cloacae*, *Kluyvera ascorbata*, *E. aerogenes*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*, ve *A. baumannii* suşlarına rastlanmıştır (Rico ve vd., 2013). Kuzey Afrika'da yapılan bir çalışmada 97 adet meyve ve sebze örneğinden 108 adet gram negatif bakteri izole edilmiştir. Bu izolatlar MALDI-TOF MS ile tanımlandığında 44'ünün (%40.74) *Enterobacteriaceae* familyasına ait olduğu tespit edilmiştir (Mesbah Zekar vd., 2017).

Usui vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada 130 sebzededen 681 bakteri izole edilmiştir. Baskın tür olarak 587 adet (%86) *Pseudomonas* spp. tanımlanmıştır. Geriye kalan türlerin ise *Acinetobacter* ( $n=14$ ) *Rahnella* ( $n=11$ ), *Enterobacter* ( $n=4$ ), *Stenotrophomonas* ( $n=4$ ), *Ochrobactrum* ( $n=2$ ), *Pantoea* ( $n=1$ ) ile *Serratia* ( $n=1$ ) cinslerine ait olduğu tespit edilmiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise en fazla rastlanan bakteri *Serratia*

spp. ( $n=36$ ) ardından *Klebsiella* spp. ( $n=31$ ) olmuştur.

Nousiainen vd., (2016) tarafından satılan taze yapraklı sebzelerin mikrobiyolojik kalitesinin araştırıldığı bir çalışmada, marul ve ıspanaktan alınan toplam 100 örnekte toplam canlı sayısının ortalama 8.6 log KOB/g, koliform bakteri sayısının ise 6.3 log KOB/g olduğu belirlenmiş, örneklerin %15'inde *E. coli* tespit edilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada marul ve ıspanaktan almış olduğumuz toplam 18 örnekte toplam *Enterobacterales* yükü ortalama olarak marulda  $3.90 \pm 2.19$  log KOB/g ve ıspanakta  $5.06 \pm 0.32$  log KOB/g olarak belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler tebliğinde hazır salatalar için verilen kriterlerde indikatör mikroorganizmalar için bir kriter bulunmazken, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 bulunmaması istenmiştir (Anonim, 2011). Elde edilen izolatlar arasında *Salmonella* spp. bulunmamasına karşın *Escherichia* spp.'nin % 2.23 oranında saptanmış olması bu örneklerin risk taşıdığına bir göstergesi kabul edilebilir.

GSBL üreten *Enterobacterales* ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda, bu bakterilerin sadece hastane ortamından izole edilmediği sebzelerde, çiftlik hayvanlarında ve bunlardan üretilen gıdalarda çıkabileceği tespit edilmiştir (Ben Sallem vd., 2012; Poeta vd., 2009). Sebzelerde antibiyotik dirençli *Enterobacteriaceae* bakterilerinin araştırılması üzerine İngiltere'de yapılan bir

çalışmada; havuçlar ile çiğ salata sebzelerinden alınan toplam 73 örnekten izole edilen bakterilerin %37.5'inin Enterobacteriaceae familyasına ait olduğu tespit edilmiştir. Suşların %70'inden fazlası ampisilin yanısıra birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere, suşların %33'ünün ise ko-amoksilav, sefotaksim veya trimetoprim'e dirençli olduğu tespit edilmiştir (Hamilton-Miller ve Shah, 2001). Tunus'taki pazarlardan toplanan maydanoz ve domateslerle ilgili yapılan bir çalışmada da GSBL pozitif *E. coli* suşları saptanmıştır (Said vd., 2015). Bizim çalışmamızda elde edilen 2 adet *E. coli* ve 1 adet *E. hermanningii* izolatu ise GSBL negatif olarak tespit edilmiştir

Romanya'da perakende olarak satılan taze ürünlerde  $\beta$ -laktamaz üreten *Enterobacteriales* varlığı araştırılmıştır. Sebzelerden elde edilen izolatların %7.9'u GSBL, %5.5'i GSBL/AmpC ve %2.4'ü Karbapenemaz üreticisi olduğu bildirilmiştir (Colosi vd. 2020). Cezayir'in Batna kentindeki taze sebzelerde GSBL, karbapenem ve kolistin dirençli Gram negatif bakterileri taramak amacıyla 400 taze sebze örneğinden 67 izolat incelenmiştir. MALDI-TOF MS yöntemiyle tanımlanan türlerden *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. maltophilia*, *E. coli* ve *C. braakii* baskın türler arasında yer almıştır. İzolatlardan 27'sinin GSBL geni, 5'inin karbapenemaz geni taşıdığı tespit edilmiştir (Chelaghma vd. 2022). Çiğ sebzedeki GSBL prevalansının incelendiği başka bir çalışmada, pazardan toplanan 305 örneğin 14'ünde (%4.6) GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* izole edilmiştir. Çiğ sebzelerin, çiğ sebze alımı yoluyla insanlara potansiyel olarak bulaşabilen GSBL'ye dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin önemli bir kaynağı olduğu gösterilmiştir (Romyasmit vd. 2021).

Tarım ortamının, taze sebzelerde GSBL üreten Enterobacteriaceae kaynağı olup olmadığını belirlemek için yapılan çalışmada, pişmemiş taze ürünlerin tüketimi yoluyla GSBL ve AmpC üreten bakterilerin yayılması halk sağlığı açısından risk oluşturduğu saptanmıştır (Blaak vd, 2014). Güney Afrika'da yapılan çalışmada, sulama suyundaki ve sebzelerdeki *E. coli* suşlarında GSBL, AmpC varlığı ve genetik benzerlik filogenetik olarak araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen izolatların

%76'sının GSBL ya da AmpC üreticisi olduğu, bunlardan 14'ünün hem GSBL hem de AmpC üreticisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, sulama suyundan ve maruldan izole edilen *E. coli*'lerin yüksek genetik benzerlik içerdiği, marula geçen GSBL pozitif *E. coli* suşlarının sulama suyu kaynaklı olabileceği ifade edilmiştir (Njage ve Buys, 2015).

Sonuç olarak; yeşil yapraklı sebzeler lağım sularının sulama suyuna karışması, hayvan barınaklarına yakın bölgelerde yapılan üretim, insan ve hayvanlar tarafından oluşan fekal bulaşlar gibi kontaminasyon kaynaklarına maruz kalabilmektedir. Gıda çalışanları aracılığıyla çapraz kontaminasyon ve kontamine gıdaların tüketilmesi yoluyla patojen bakteriler toplumda yayılabilir. Özellikle antibiyotik direnç mekanizmalarına sahip olan suşların yayılması toplum sağlığı açısından çok önemlidir. Yeşil sebzelerde rastalanan GSBL ve karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriales* türlerinin varlığı antimikrobiyal direnç sorunu konusunda gerekli tedbirlerin alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışma; Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje numarası: FYL-2019-2808.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

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

### YAZAR KATKILARI

Makale, Vasfi Mehmet Balki'nin Nükhet Nilüfer Demirel Zorba ve Nesrin Çakıcı danışmanlığında yürüttüğü yüksek lisans tez çalışmasından üretilmiştir. Çalışma Nükhet Nilüfer Demirel Zorba ve Nesrin Çakıcı tarafından planlanmış, Vasfi Mehmet Balki laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirmiş, antibiyotik direncin doğrulanması ve makale taslağının oluşturulması kısmında her üç yazarda katkı vermiştir. Yazarlar makalenin son halini okuyarak onaylamışlardır.



## KAYNAKLAR

Anonymous (2011). Türk Gıda Kodeksi. Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, 29 Aralık 2011 tarih ve 28157 sayılı Resmî Gazete, Ankara.

Ayhan, Ş., Kahve, H. İ., Aydın, F., Ardiç, M. (2020). Antibiotic resistance and hemolytic activity in enterococci isolated from tulum cheese sold in Aksaray province. *GIDA*, 45(4): 689-698. <https://doi.org/10.15237/gida.GD20068>

Bain, R., Cronk, R., Hossain, R., Bonjour, S., Onda, K., Wright, J., Yang, H., Slaymaker, T., Hunter, P., Prüss-Ustün, A., and Bartram, J. (2014). Global assessment of exposure to faecal contamination through drinking water based on a systematic review. *Tropical Medicine & International Health*, 19: (8), 917-927. <https://doi.org/10.1111/tmi.12334>

Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Saenz, Y., Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Jouini, A., ... & Torres, C. (2012). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9:(12), 1137-1142. 4. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1267>

Blaak, H., van Hoek, A. H., Veenman, C., van Leeuwen, A. E. D., Lynch, G., van Overbeek, W. M., & de Roda Husman, A. M. (2014). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase-and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*, 168, 8-16. 4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.006>

Budak, S., Aktaş, Z., & Erdem, H. (2012). Enterik Gram-negatif bakterilerde laboratuvarından kliniğe karbapenemazlar. *Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials*, 1,1-11.

Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machoda, E., Peixe, L., Baquero, F., Coque, TM. (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing Enterobacteria In Europe. *Clin Microbiol Infect*, 14 (Suppl1), 144-153. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850>.

Chelaghma, W., Loucif, L., Bendjama, E., Cherak, Z., Bendahou, M., Rolain, J.M. (2022). Occurrence of Extended Spectrum Cephalosporin-, Carbapenem- and Colistin-Resistant Gram-Negative Bacteria in Fresh Vegetables, an Increasing Human Health Concern in Algeria. *Antibiotics*. 11, 988. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11080988>

Cheng, K, Chui, H., Domish, L., Hernandez, D., Wang, G. (2016). Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics Clin App*, 10:(4), 346-357. <https://doi.org/10.1002/prca.201500086>

Colosi, I.A., Baciu, A.M., Opris, R.V., Peca, L., Gudat, T., Simon, L.M., Colosi, H.A., Costache, C. (2020). Prevalence of ESBL, AmpC and carbapenemase-producing *Enterobacteriales* isolated from raw vegetables retailed in Romania. *Foods*. 9, 1726. <https://doi.org/10.3390/foods9121726>

Coudron, P. E. (2005). Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: (8), 4163-4167. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4163-4167.2005>

De Oliveira Elias, S., Tombini Decol, L., and Tondo, E. C. (2018). Foodborne outbreaks in Brazil associated with fruits and vegetables: 2008 through 2014. *Food Quality and Safety*, 2 (4), 173-181. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy022>

Demirer, B. ve Özdemir M. (2021). Gıdalardaki Antibiyotik Kalıntıları. *Academic Platform Journal of Halal Lifestyle*, 3:(1), 17-25.

Encu, Ş. B., Soykut, E. A., Çakır, İ. (2022). Geleneksel yoğurtlardan izole edilen laktik asit bakterilerinin maldi tof ms biotyper sistemi ile tanımlanması ve bazı starter kültür özelliklerinin belirlenmesi. *Gıda*, 47 (6), 1059-1082. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22088>

EUCAST. 2022. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.1. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_12.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_12.0_Breakpoint_Tables.pdf)

- Fırıncioğulları, B., Öner, Z. (2022). Kolesterol düşürücü etkilere sahip lactobacillus spp. suşlarının peynirde başlatıcı kültür olarak kullanımı. *GIDA*, 47(2), 266-276. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21141>
- Franz, E., Semenov, A. V., & van Bruggen, A. H. C. (2008). Modelling the contamination of lettuce with *Escherichia coli* O157: H7 from manure-amended soil and the effect of intervention strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (5), 1569-1584. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03915.x>
- Giske, C. G., Gezelius, L., Samuelsen, Ø., Warner, M., Sundsfjord, A., & Woodford, N. (2011). A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical microbiology and infection*, 17(4), 552-556. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03294.x>
- Gupta, G., Tak, V., Mathur, P. (2014). Detection of AmpC  $\beta$  lactamases in gram-negative bacteria. *Journal of Laboratory Physicians*, 6: 1-6. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.129082>
- Hamilton-Miller, J. M. T., & Shah, S. (2001). Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(1), 81-83. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00353-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00353-3)
- Hudson, J. A., Frewer, L. J., Jones, G., Brereton, P. A., Whittingham, M. J., Stewart, G. (2017). The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 131-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.007>
- Jiang, X., Shepherd, M. (2009). The role of manure and compost in produce safety. X. Fan, B.A. Niemira, C.J. Doona, F.E. Feeherry, R.B. Gravani (Eds.), *Microbial Safety of Fresh Produce*, Wiley-Blackwell Publisher, pp. 143-166.
- Kısa, Ç., Tuncer, Y. (2021). Kanatlı etlerinde staphylococcus aureus yaygınlığı ve antibiyotik direnç profillerinin, antibiyotik direnç ve enterotoksin genlerinin belirlenmesi. *GIDA*, 46(3), 692-706. <https://doi.org/10.15237/gida.GD21048>
- Mesbah Zekar, F., Granier, S. A., Marault, M., Yaici, L., Gassilloud, B., Manceau, C., Touati, A., and Millemann, Y. (2017). From farms to markets: Gram-negative bacteria resistant to third-generation cephalosporins in fruits and vegetables in a region of north africa. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1569. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01569>
- Njage, P. M., Buys, E. M. (2015). Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 462-473. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12234>
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poriel L, Woodford N, Miriagou V. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection* 18(5): 432-8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x>
- Nordmann, P., Poirel, L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(6), 321-331. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x>
- Nousiainen, L. L., Joutsen, S., Lunden, J., Hänninen, M. L., & Fredriksson-Ahomaa, M. (2016). Bacterial quality and safety of packaged fresh leafy vegetables at the retail level in Finland. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.020>
- Poeta, P., Radhouani, H., Pinto, L., Martinho, A., Rego, V., Rodrigues, R., Gonçalves, A., Rodrigues, J., Estepa, V., Torres, C., and Igrejas, G. (2009). Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Journal of Basic Microbiology*, 49(6); 584-588. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900066>
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R., & Nordmann, P. (1999). Molecular and

- biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:(3), 573-581. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.3.573>
- Rico, H., Gozalbo, D., Sebastia, C., & Falomir, M.P. (2013). Enterobacter cloacae in fresh vegetables: A potential carrier of antibiotic resistances to consumers. *Food Studies: An Interdiscipl J*, 2, 1–7.
- Romyasamit C, Sornsenee P, Chimplee S, Yuwalaksanakun S, Wongprot D, Saengsuwan P. 2021. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from raw vegetables retailed in Southern Thailand. *PeerJ* 9:e11787 <https://doi.org/10.7717/peerj.11787>
- Said, L. B., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, C. A., Boudabous, A., Torres, C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.023>
- Saksena, R., Malik, M., Gaiind, R. (2020). Bacterial contamination and prevalence of antimicrobial resistance phenotypes in raw fruits and vegetables sold in Delhi, India. *Journal of Food Safety*, 40, (1), e12739. <https://doi.org/10.1111/jfs.12739>
- Szczech, M., Kowalska, B., Smolinska, U., Maciorowski, R., Oskiera, M., Michalska, A. (2018). Microbial quality of organic and conventional vegetables from Polish farms. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 155-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.018>
- Taormina, P. J., Beuchat, L. R. (1999). Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa seeds. *Journal of food protection*, 62 (4), 318-324. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.4.318>
- Tien, Y. C., Li, B., Zhang, T., Scott, A., Murray, R., Sabourin, L., Topp, E. (2017). Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest. *Science of the Total Environment*, 581, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.138>
- Usui, M., Ozeki, K., Komatsu, T., Fukuda, A., and Tamura, Y. (2019). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria on fresh vegetables in Japan. *Journal of Food Protection*, 82, (10), 1663-1666. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-138>
- Ünlütürk A., Turantaş F. (2015). *Gıda Mikrobiyolojisi*, Meta Basım, İzmir, s:16.
- Van Hoek, A. H., Veenman, C., van Overbeek, W. M., Lynch, G., de Roda Husman, A. M., & Blaak, H. (2015). Prevalence and characterization of ESBL-and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.014>
- Wadamori, Y., Gooneratne, R., Hussain, M. A. (2017). Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97 (5), 1396-1403. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8125>



**FARKLI AMBALAJ MATERYALLERİ ve VAKUM/MODİFİYE ATMOSFER  
AMBALAJLAMININ DİLİMLENMİŞ HATAY PEYNİRİNİN KALİTESİ VE RAF  
ÖMRÜNE ETKİSİ**

**Bengisu Toplu<sup>1</sup>, Hatice Sıçramaz<sup>2</sup>, Zehra Ayhan<sup>2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Hatay, Türkiye

<sup>2</sup>Sakarya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Sakarya, Türkiye

Geliş/Received: 07.03.2023; Kabul/ Accepted: 24.04.2022; Online baskı/ Published online: 10.05.2023

Toplu, B., Sıçramaz, H., Ayhan, Z. (2023). Farklı ambalaj materyalleri ve vakum/modifiye atmosfer ambalajlamanın dilimlenmiş Hatay peynirinin kalitesi ve raf ömrüne etkisi. GIDA (2023) 48 (3) 587-601 doi: 10.15237/gida. GD23032

Toplu, B., Sıçramaz, H., Ayhan, Z. (2023). The effects of different packaging materials and vacuum/modified atmosphere packaging methods on the quality and shelf life of sliced Hatay cheese. GIDA (2023) 48 (3) 587-601 doi: 10.15237/gida.GD23032

**ÖZ**

Bu çalışmada ambalajsız olarak satışa sunulan ve yöresel bir peynir çeşidi olan Hatay peynirinde uygun ambalaj malzemesi ve teknolojilerinin kullanımı ile daha kaliteli ve uzun raf ömrüne sahip bir ürün elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu nedenle dilimlenmiş peynir örnekleri modifiye atmosfer (%50 CO<sub>2</sub> ve %50 N<sub>2</sub>), hava (%21 O<sub>2</sub> ve %79 N<sub>2</sub>) ve vakum altında üç farklı geçirgenlikte ambalaj malzemeleri (Koekstrude PA/PE, OPET/OPA/OPP ve PP/PA/EVOH/PE) ile ambalajlanmış ve 4°C'de 60 gün süreyle depolanmıştır. Depolama süresince tepe boşluğu gaz oranları (%O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>), fizikokimyasal ve duyu analizleri yapılmıştır. Depolama süresince ambalajlı uygulamalarda ürün beyazlığı ve tekstür daha iyi korunmuş, duyu nitelikler kabul edilebilir bulunmuştur. Tüm uygulamaların titrasyon asitliği ve TBARS değerleri artmış ve pH değerleri azalmıştır. Ancak depolama boyunca en iyi sonuçlar gaz geçirgenliği en düşük olan PP/PA/EVOH/PE'de vakum uygulamasında ve yüksek karbondioksitli MAP uygulamalarında alınmıştır. Sonuç olarak, ambalajsız üründe raf ömrü 5 gün, ambalajlı peynirlerde raf ömrü 60 gün olarak önerilmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ambalaj materyali, Hatay peyniri, modifiye atmosfer paketleme (MAP), fizikokimyasal özellikler ve raf ömrü

**THE EFFECTS OF DIFFERENT PACKAGING MATERIALS AND  
VACUUM/MODIFIED ATMOSPHERE PACKING METHODS ON THE  
QUALITY AND SHELF LIFE OF SLICED HATAY CHEESE**

**ABSTRACT**

The aim of this study is to determine quality and shelf life for a regional unpackaged Hatay cheese by the use of appropriate packaging materials and technologies. The sliced cheese was packaged under a modified atmosphere (50% CO<sub>2</sub> and 50% N<sub>2</sub>), air (21% O<sub>2</sub> and 79% N<sub>2</sub>) and vacuum using three different packaging materials with different permeabilities (Coextruded PA/PE, OPET/OPA/OPP and PP/PA/EVOH/PE) and stored at 4°C for 60 days. Headspace gas concentration (O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> %), physicochemical and sensory analysis were performed during storage. Whiteness and texture of

\*Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: zehraayhan@sakarya.edu.tr

☎: +90 (264) 295 3858

☎: +90 (264) 295 5601

Bengisu Toplu; ORCID no: 0009-0009-3578-833X

Hatice Sıçramaz; ORCID no: 0000-0002-5943-9566

Zehra Ayhan; ORCID no: 0000-0001-9114-4445

packaged cheese were preserved better than unpackaged product, and were sensorially acceptable during entire storage. Titratable acidity and TBARS increased and pH decreased at all applications during storage. However, the best results were obtained for PP/PA/EVOH/PE with the lowest gas permeability under vacuum and high carbon dioxide-MAP applications. The shelf life of unpackaged and packaged product was 5 days and 60 days, respectively.

**Keywords:** Packaging material, Hatay cheese, modified atmosphere packaging, physicochemical properties and shelf life

## GİRİŞ

Hatay peyniri, starter kültür eklenmeden süte yalnızca rennet enzimi ilavesi ile üretilen, Hatay ilinin geleneksel bir peynir çeşididir. Coğrafi olarak henüz işaretlenmediği için üretim yöntemi işletmeden işletmeye değişebilmektedir. Genellikle yalnız inek sütünden üretilirken, dönemsel olarak koyun ve keçi sütleri de karıştırılabilmektedir (Çayır ve Güzeler, 2020). Üretiminde, az yağlı pastörize süte enzim ilave edilerek pıhtılaşma sağlanmakta ve peynir suyu yeterince süzildikten sonra tuzlanarak taze halde tüketime sunulmaktadır. Ürünün standart üretim prosesi bulunmadığı gibi, ambalajlama yönteminin ve ambalaj materyalinin ürüne etkileri üzerine de herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Ambalaj, gıdayı hava, nem, koku, mikroorganizmalar gibi ürün kalitesini düşüren dış etkilere karşı korumaktadır. Mikrobiyal ve olası kimyasal bulaşılara karşı hijyen sağladığı gibi ürünün duyu kalitesini korumakta, üründen aroma kaybı gerçekleşmesini önlemektedir. Aynı zamanda ürünün depolanmasını ve taşınabilirliğini sağlamaktadır. Bu amaçlarla kullanılan ambalaj filminin, gıdanın özelliklerine uygun olarak seçilmesi önemlidir. Gıdanın kalite özelliklerinin korunmasında ambalaj içi gaz karışımı da önemlidir. Ambalaj filminin ısı yapıştırılması öncesinde, ambalaj içinde bulunan hava atmosferi negatif basınçla uzaklaştırılarak vakum ambalajlama yapılabilmektedir. Modifiye atmosfer ambalajlama (MAP) yönteminde ise, gıdayı çevreleyen tepe boşluğunda bulunan hava atmosferi, oksijen oranı düşürülerek, azot ve/veya karbondioksit oranı yüksek olan farklı bir gaz karışımı ile değiştirilir. Peynirin ambalajlanmasında uygulanan oksijensiz MAP ile oksidasyona bağlı reaksiyonlar önlenmiş olur; anaerobik mikroorganizma gelişimi ve lipoliz reaksiyonları yavaşlar, ürünün raf ömrü artar (Ayhan, 2022). Peynirlerde MAP uygulamasının

daha yumuşak ve beğenilen tekstür sağladığı da belirtilmiştir (Jafarzadeh vd., 2021). MAP uygulaması doğru şekilde yapılmadığı takdirde istenmeyen sonuçlara da yol açabilir. Bu nedenle, ambalajlama işleminde kullanılan gaz karışımı ve oranlarının doğru ayarlanması için bilimsel çalışmalara ihtiyaç vardır (Lee vd., 2008).

Ambalaj içi gaz karışımının yanı sıra, ambalajlamada kullanılan materyalin gaz geçirgenliği (oksijen ve karbondioksit) ve diğer mukavemet özellikleri, gıdanın raf ömrünü belirlemede önemlidir. Ambalaj materyali seçimi, ambalajlanacak ürünün özelliklerine, depolama ve taşıma koşullarına, ambalajlama yöntemine ve tüketicinin gereksinimlerine bağlı olarak belirlenir. Uzun raf ömrü istenilen ürünlerde özellikle geçirgenliği düşürmek amacıyla laminasyon teknikleriyle üretilen çok katmanlı ambalajlar tercih edilmektedir. Polietilen-poliamid malzemeler (PA/PE), gıdaların oksijen, nem ve aroma kaybını önlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Etilenvinil alkol (EVOH) ya da polivinilden klorür (PVDC) içeren bariyerli filmler, oksidasyona ve neme duyarlı ürünlerin ambalajlanmasında yüksek koruyuculuk gösteren çok katmanlı ambalaj malzemeleridir. EVOH'un oksijen bariyeri özelliğine karşılık, neme hassas olması nedeniyle gıdaya direk temas etmesi uygun olmayıp, başka materyaller arasında lamine edilmektedir (Ayhan, 2022). Polietilen tereftalat / poliamid / polipropilen laminasyonundan oluşan OPET/OPA/OPP filmleri de yine gıda ambalajlamada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bileşimindeki OPET, yüksek mekanik dayanımı ve düşük su buharı geçirgenliği nedeniyle kullanılırken, OPA yüksek bariyer özellikleri ve termal dayanımı nedeniyle kullanılır. OPP ise esnekliği ve sızdırmazlık özellikleri nedeniyle tercih edilir (Morris, 2016).

Doğru ambalajlama, gıdanın kalitesinin korunmasına, tazeliğinin ve raf ömrünün uzatılmasına ve tüketicilere güvenli bir şekilde sunulmasına yardımcı olur. Hatay peynirinin düşük asitlikte bir taze peynir olması, olgunlaşmış peynirlere kıyasla kısa raf ömrüne sahip olması ve açıkta satılması nedeniyle uygun şekilde ambalajlanması ürün kalitesini korumada ve raf ömrünü arttırmada çok önemlidir.

Bu çalışma kapsamında, Hatay peyniri üç farklı ambalaj materyaliyle üç farklı gaz karışımında ambalajlanarak 4°C'de 60 gün süreyle depolanmıştır. Depolama süresince ürünlerin kalitesi fizikokimyasal ve duyu analizlerle incelenmiş ve raf ömrü tespit edilmiştir. Geleneksel gıdaların kendine özgü özelliklerinin korunarak raf ömrünün uzatılması daha fazla tanınmasına, kültürel mirasın devamlılığına ve ekonomik gelişime katkı sağlayacaktır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Hatay Peyniri Üretimi

Ambalajlamada kullanılacak olan peynir, günlük olarak üretilmiştir. Çiğ süt, 70°C'de 20 dk pastörize edildikten sonra 35°C'ye soğutulmuştur. Süte 1:10000 oranında kalsiyum klorür (Caso-Fcc Flakes, Belçika) eklenmiş ve mayalanma 60 dk'da

tamamlanacak şekilde 1:16000 kuvvetindeki mayadan (Maysa Mysecoren 200, Türkiye) ilave edilmiştir. Ardından pıhtı kırılmış ve peynirin fazla suyu, baskı plakaları yardımıyla uzaklaştırılmıştır. 1,5 saat baskıda kalan pıhtı 2 cm<sup>3</sup> boyutunda dilimlenmiş ve 20°C'deki 12°Bomelik salamura suyunda 2 saat bekletilmiştir. Ambalajlama öncesi 16 saat 4°C'de 10°Bomelik salamurada bekletildikten sonra salamura suyu uzaklaştırılmıştır.

### Peynirin Ambalajlanması

Üretilen dilimli Hatay peyniri, 3 farklı malzemede ve 3 farklı atmosferde ambalajlanmıştır. Ambalajlanan ürünlerin ambalaj materyali ve ambalaj içi gaz karışımlarına ait özellikler Çizelge 1'de verilmiştir. Çok katmanlı PA/PE torba ambalajı (M1) ve OPET/OPA/OPP filmleri (M2) Apack Ambalaj Makine San. Tic. Ltd. Şti. (İstanbul)'den, EVOH bariyerli PP/PA/EVOH/PE film (M3) ise Süperfilm A.Ş. (Gaziantep)'den temin edilmiştir. Film halinde temin edilen ambalajlar da 15x25 cm boyutunda kesilerek torbalar oluşturmak üzere ısıl yapıştırıcıyla yapıştırılmıştır. Hazırlanan torba ambalajlar %96'lık etanolla (v/v) dezenfekte edildikten sonra aseptik koşullarda 35°C'de 2 saat kurumaya bırakılmıştır.

Çizelge 1. Hatay peynirine uygulanan ambalaj malzemeleri ve teknik özellikleri

Table 1. Technical properties of packaging materials applied to Hatay cheese

| Ambalaj materyali kodu<br><i>Packaging material code</i> | Ambalaj materyali<br><i>Packaging material</i> | Ambalaj materyali özellikleri<br><i>Properties of packaging material</i> |  |   |
|--|--|--|--|---|
|  |  | Kalınlık<br><i>Thickness</i><br>(µm)                                     | OTR*<br>(cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> ·gün) | CO <sub>2</sub> TR*<br>(cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> ·gün) |
| M1   | PA/PE  | 95   | 50.0   | 180.0   |
| M2   | OPET/OPA/OPP                                   | 88   | 22.7   | 95.6  |
| M3   | PP/PA/EVOH/PE                                  | 115  | 2.0  | -   |

| Ambalaj atmosferi kodu<br><i>Packaging atmosphere code</i> | Gaz oranları (%)<br><i>Gas ratios (%)</i> |                |                 |
|--|---|----------------|-----------------|
|  | N <sub>2</sub>                            | O <sub>2</sub> | CO <sub>2</sub> |
| ATM  | 79  | 21             | 0               |
| MAP  | 50  | 0              | 50              |
| VAK  | 0   | 0              | 0               |

ATM: hava atmosferi, MAP: modifiye atmosfer paketleme, VAK: vakum

\* OTR: Oksijen geçiş hızı, CO<sub>2</sub>TR: Karbondioksit geçiş hızı

ATM: *air atmosphere*, MAP: *modified atmosphere packaging*, VAK: *vacuum*

\* OTR: *Oxygen transmission rate*, CO<sub>2</sub>TR: *Carbon dioxide transmission rate*

Suyu süzülen dilimlenmiş peynirler daha önceden hazırlanan ve dezenfekte edilen torba ambalajlara 200 g olacak şekilde yerleştirilmiştir. Ürün içeren torba ambalajlar, tek odalı ambalajlama makinesine (Reepack, RV 300, Almanya) kombine edilen üçlü gaz mikseri (KM60-3, Witt, Almanya) yardımıyla ambalaj içi gaz karışımı ayarlanarak kapatılmıştır. Üç farklı gaz ortamından hava atmosferiyle ambalajlananlar ATM, modifiye atmosfer ile ambalajlananlar MAP, vakum ambalajlananlar VAK olarak adlandırılmış ve uygulanan bu gaz bileşimleri Çizelge 1’de verilmiştir. Ambalajsız peynirler ise kontrol grubu olarak depolama süresince analiz edilmiştir. Üretimler iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Depolamanın 0., 5., 10., 20., 30., 45. ve 60. günlerinde peynirler fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri açısından analiz edilmiştir. Analiz günlerinde ayrıca ambalaj içi gaz kompozisyonu, tepe boşluğu gaz analiziyle belirlenmiştir. Analizler en az iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

#### **Tepe Boşluğu Gaz Analizi**

Gaz karışımı içeren ambalajların tepe boşluğundaki %O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> (v/v) oranları, ambalaj açılmadan önce torba ambalaj yüzeyine yapıştırılan septumdan bir iğne ile gaz analizörü (Witt-Oxybaby, Gasetechnik, Germany) kullanılarak belirlenmiştir. Vakum ambalajlarda tepe boşluğu bulunmadığı için gaz analizi yapılmamıştır.

#### **Fizikokimyasal Analizler**

##### **Renk (Beyazlık indeksi)**

Dilimlenmiş peynir örneklerinin rengi Minolta (CR-400, Osaka, Japonya) renk ölçüm cihazı ile CIE L\*a\*b\* ölçeği kullanılarak ölçülmüştür. Alet illumina C’ye ayarlanmış ve standart beyaz yansıtıcı levha kullanılarak kalibre edilmiştir. Ortalama L\*, a\* ve b\* değerleri, Judd ve Wyszecki (1975) tarafından önerilen aşağıdaki formüle yerleştirilerek beyazlık indeksi (WI) hesaplanmıştır.

$$\text{Beyazlık indeksi (WI)} = 100 - [(100-L)^2 + a^2 + b^2]^{1/2}$$

##### **Tekstür (Sertlik ve Elastikiyet)**

Peynirlerde tekstür profil analizi TA-XT Plus (Stable Micro System, İngiltere) doku analizörü ile

gerçekleştirilmiştir. 2x2 cm boyutlarında dilimlenmiş ürünlerin sertlik ve elastikiyet özellikleri, Gunasekaran ve Ak (2002) tarafından önerildiği şekilde, 5 cm çapındaki silindirik prob ve 30 kg yük hücresi kullanılarak 2 mm/s test hızında 16 mm uzaklığında baskı uygulanarak test edilmiştir.

##### **pH ve Titrasyon Asitliği**

10 g peynir örneği aynı oranda suda homojenize edilerek pH değeri ölçülmüştür (WTW-315, Weilheim, Almanya). Titrasyon asitliği analizi, AOAC (2000)’e göre yapılmış, sonuçlar laktik asit cinsinden hesaplanmıştır.

##### **Lipid Oksidasyonu**

Depolama süresince lipid oksidasyonu tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) analizi ile belirlenmiştir. King (1962)’de belirtilen TBARS yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. 10 g peynir örneği, 25 mL distile suda homojenize edildikten sonra su banyosunda 30°C’ye ısıtılmıştır. Üzerine 1 mL TCA (1 g / 1 mL) ve 2 mL %95’lik etanol (v/v) eklenmiştir. 30°C’lik su banyosunda 5 dk bekletildikten sonra filtre kağıdından (Whatman No. 4) süzölmüştür. Filtrat, saf su ile 50 ml’ye tamamlanmış ve 4 ml’si deney tüpüne alınmıştır. Üzerine 1 mL %1,4’lük TBA çözeltisi (%95’lik etanolde hazırlanmış) eklendikten sonra tüpler vorteksenerek 60°C’de 1 saat inkübe edilmiştir. 532 nm’de kör çözeltiye karşı absorbans (UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçümü yapılmıştır. Şahit olarak %2 TCA (w/v) ve %4 etanol (v/v) içeren çözelti kullanılmıştır. Standart malonaldehit (MDA) kalibrasyon eğrisi için 1,1,3,3-tetraetoksipropan (TEP) kullanılmıştır. 532 nm’de okunan absorbans değerleri, ekstraksiyon katsayısı ile çarpılarak TBARS değerleri (mg MDA / kg örnek) elde edilmiştir. Ekstraksiyon katsayısının hesaplanmasında filtrat yerine şahit (% 2 TCA + % 4 etanol) kullanılmıştır (Pikul vd., 1989).

##### **Duyusal Analizler**

Dilimlenmiş peynir örneklerinin depolama süresince duyuşal değerlendirmesi 12 kişilik deneyimli panelist grubu ile yapılmıştır. Oda sıcaklığında renk, tat, tekstür ve genel beğeni 9’luk skala kullanılarak değerlendirilmiştir. Puanlama;

1=çok kötü (sarı renkte, ransid tatta, yumuşak yapıda), 5=kabul edilebilir, 9=çok iyi (beyaz renkte, beğenilen tat ve tekstürde) olacak şekilde duyusal değerlendirme formunda belirtilmiştir. Ürünün genel kabul edilebilirliği 9 noktalı hedonik ölçekte değerlendirilmiş ve 1=hiç beğenmedim, 9=çok beğendim olarak puanlanmıştır.

### İstatistiksel Analiz

İki tekrarlı üretimin ikişer tekrarlı analiz sonuçlarıyla elde edilen deneysel veriler, 3-yönlü ANOVA ve Duncan çoklu kıyaslama testleri ile %95 güven aralığında SAS (ver.8.02, SAS Institute, Cary, NC, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Deneysel faktörler (ambalaj filmi, ambalaj içi gaz kompozisyonu ve depolama

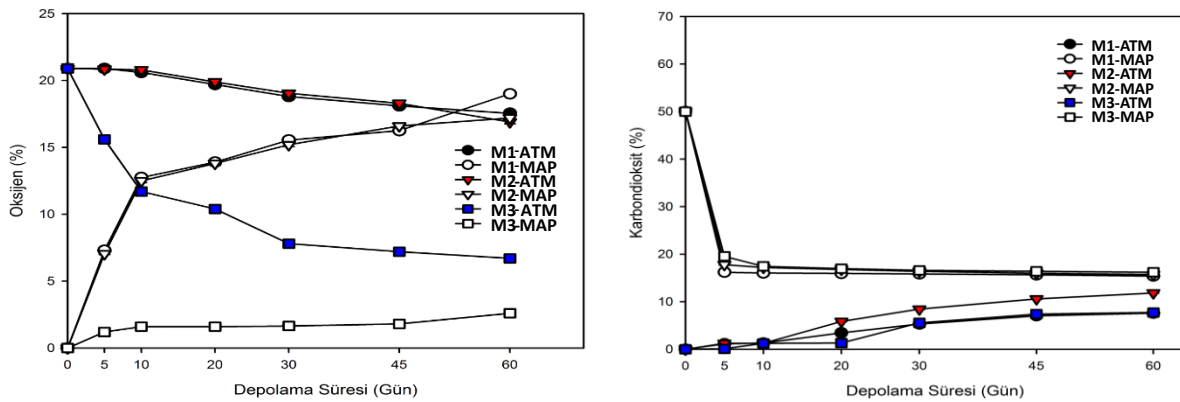
süresi) ile bunların etkileşimlerinin fizikokimyasal ve duyusal kalite parametreleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada üretilen peynirin kuru madde, protein, yağ ve tuz oranları sırasıyla %42.6, %15.2, %17.0 ve %7.3 olarak ölçülmüş ve peynir Çizelge 1’de verildiği şekilde 9 farklı grupta ambalajlanmıştır.

### Tepe Boşluğu Gaz Oranları

Peynir ambalajlarının tepe boşluğundaki %O<sub>2</sub> ve %CO<sub>2</sub> gaz oranlarının 60 günlük depolama süresince değişimi Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Farklı ambalaj materyali ve atmosferde ambalajlanan peynir dilimlerinde depolama sürecinde ambalaj tepe boşluğunda ölçülen oksijen ve karbondioksit oranları (%) (M1: Koekstrude PA/PE, M2: OPET/OPA/PPP, M3: PP/PA/EVOH/PE, ATM: %21 O<sub>2</sub> + %79 N<sub>2</sub>, MAP: %50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub>)  
Figure 1. Oxygen and carbon dioxide ratios (%) measured in the packaging headspace during the storage period of sliced cheese packed in different packaging materials and atmospheres

Tüm malzemelerin hava (ATM) uygulamaları %20.9 O<sub>2</sub> ve %0.0 CO<sub>2</sub> gaz bileşimi ile başlamıştır. Depolama boyunca oksijen oranı tüm uygulamalarda azalan bir eğilim göstermiştir. Depolama sonunda ambalajların tepe boşluğundaki oksijen oranları M1’de %17.6, M2’de %16.9 ve M3’te %6.7 olarak tespit edilmiştir. M3’ün oksijen geçiş hızının (OTR) çok düşük olduğu ve ambalaj malzemesinden dış atmosfere gaz geçişinin ihmal edilecek düzeylerde olduğu düşünüldüğünde, ambalaj içindeki oksijenin ürün tarafından kullanıldığı ve bu

nedenle oksijen oranının depolama boyunca diğer ambalaj malzemelerine kıyasla daha belirgin bir azalış gösterdiği belirtilebilir. M1 ve M2 malzemelerinin tepe boşluklarındaki oksijen oranlarında depolama boyunca azalma söz konusu olsa da bu malzemelerdeki OTR’lerin daha yüksek olması nedeniyle iç atmosferdeki oksijen oranlarında önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum belirli düzeyde oksijenin bu ambalajlarda da ürün tarafından kullanıldığı göz önüne alındığında, iç atmosferde azalan oksijen yerine dış atmosferden malzeme



geçirgenliğine bağlı olarak içeriye oksijen geçişi ile açıklanabilir. Tüm ambalaj malzemelerinin tepe boşluğundaki oksijen azalışı, oksijenin oksidasyon ve mikrobiyal faaliyetlerde kullanılmasıyla ilişkilendirilebilir. ATM uygulamalarının CO<sub>2</sub> oranları depolama süresince artan bir eğilim göstermiştir. Depolama sonunda tüm ambalaj malzemelerinde birbirlerine yakın karbondioksit oranları tespit edilmiş olup en yüksek değer M2 malzemesinde kaydedilmiştir.

MAP uygulamasında tüm ambalajlarda başlangıç O<sub>2</sub> oranı %0.0 ve CO<sub>2</sub> oranı %50.0'dir. Depolama süresince O<sub>2</sub> oranı tüm ambalaj malzemelerinde artış göstermiştir. Depolama sonunda O<sub>2</sub> oranı M1, M2 ve M3'te sırasıyla %19.0, %17.2 ve %2.6 olarak tespit edilmiş olup, bu durumun da yine malzemelerin Çizelge 1'de verilen OTR değerleriyle ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Tüm ambalaj malzemelerinin CO<sub>2</sub> oranlarında özellikle ilk 5 günlük depolamada hızlı bir düşüş görülmüştür ve bu durum karbondioksitin yağda ve suda çözünürlüğü ile ilişkilendirilebilir. Depolamanın geri kalan sürecinde ambalajların CO<sub>2</sub> oranlarında önemli bir değişim olmamıştır. Depolama sonunda CO<sub>2</sub> oranları M1, M2 ve M3'te sırasıyla %15.4, %15.7 ve %16.2 olarak tespit edilmiştir ve bu durum ambalaj malzemelerinin CO<sub>2</sub>TR'leri ile ilişkilendirilebilir.

Eliot vd. (1998) tarafından Mozzarella peyniri ile yapılan çalışmada, vakum, hava atmosferi ve farklı oranlarda CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> içeren MAP denemelerinin tümünde tepe boşluğundaki CO<sub>2</sub> oranı depolama boyunca artış göstermiştir. Bu artışın peynirde meydana gelen aerobik mikrobiyal aktiviteden kaynaklandığı ve depolama süresi ile kullanılan ambalaj filminin karbondioksit geçirgenlik oranının (CO<sub>2</sub>TR) da tepe boşluğundaki gaz bileşiminde etkili olduğu belirtilmiştir. Cottage peynirinde yapılan bir çalışmada ise mikrobiyal solunum hızı ile ambalaj malzemesinin oksijen geçirgenliği arasında denge sağlanması nedeniyle tepe boşluğundaki O<sub>2</sub> konsantrasyonu depolama boyunca nispeten sabit kalmıştır (Maniar vd., 1994). Hava atmosferinde ambalajlanan peynirlerde oksijen konsantrasyonunun düşmesi ise, oksijenin aerobik mikroorganizmalar tarafından tüketilmesiyle ilişkilendirilmiştir (Fedio

vd., 1994; Eliot vd., 1998). Ambalaj içi gaz konsantrasyonunun etkisi üzerine yapılan başka bir çalışmada, MAP uygulanan Domiati peynirlerinden tepe boşluğundaki CO<sub>2</sub> oranı en yüksek olanın hem kimyasal hem de duyu kalite açısından en iyi özellikteki ürün olduğu belirlenmiştir (Atallah vd., 2021).

### **Fizikokimyasal Özellikler**

#### ***Beyazlık İndeksi***

Beyaz peynirlerde beyazlık karakteristik bir özelliktir. Bu nedenle depolama süresince dilimlenmiş peynirlerde beyazlık indeks değeri (WI) incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Başlangıç WI değeri 85.9'dır, depolama süresince tüm uygulamalarda azalmıştır. En büyük düşüş kontrol grubunda tespit edilmiş olup, 60. günde WI değeri 78.3 olarak ölçülmüştür. Depolamanın son gününde ambalajlı örneklerin WI değerleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmemiştir ( $P > 0.05$ ). Sonuç olarak depolama süresinin WI değeri üzerinde daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Favati vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada, bizim çalışmamızda olduğu gibi, farklı gaz karışımları uygulandığında Provolone peynirinin renk değerlerinin etkilenmediği belirlenmiştir. Peynirlerin özellikle ışığa maruz kalarak okside olması sonucu renginin sararması, tüketicilerin ürün beğenisini azaltmaktadır. Bu durumun MAP ile kontrol altına alınabileceği belirlenmiştir (Kristensen vd., 2000). Bir çalışmada, kağıt ambalajda ambalajlanan peynirlerin %1-3 O<sub>2</sub> ve %19-21 CO<sub>2</sub> bileşimindeki MAP ile ambalajlanması halinde raf ömrünün arttığı ve depolama sonunda MAP uygulanan örneklerde daha yüksek WI değeri ölçüldüğü belirlenmiştir (Rodriguez-Aguilera vd., 2011). Farklı ambalaj malzemelerinin depolama sırasında renge etkisinin incelendiği bir çalışmada, koekstrüde PE/EVOH/PA/PE filmlerin 65 günlük depolama süresince peynir rengini oldukça iyi koruduğu belirlenmiştir (Piscopo vd., 2019).

#### ***Tekstür***

Gıdaların tekstürel niteliklerinin, tüketicilerin satın alma kararında önemli bir rol oynadığı ve özellikle peynir gibi gıdalarda tekstürün, renk ve kokudan daha öncelikli olduğu bilinmektedir

(Gunasekaran ve Ak, 2002). Farklı ambalaj malzemeleri kullanılarak farklı atmosferlerde ambalajlanan Hatay peyniri dilimlerinin depolama süresince gözlenen sertlik ve elastiklik değerleri Çizelge 2’de verilmiştir. Kontrol örnekleri, açıkta depolanan ürünü temsil ettiği için depolama sırasında kuruyarak kırılgan yapı kazanmış ve bu nedenle tekstür analizi ancak 20. güne kadar yapılabilmektedir.

Depolama öncesi ürünün sertlik değeri 0.07 N, elastiklik değeri 0.26 mm olarak ölçülmüştür (Çizelge 2). Depolama sonunda yapılan istatistiksel incelemeye göre, ambalaj materyalindeki değişimin ve ambalaj içi atmosfer bileşiminin ürünlerin genelinde sertliğe ve elastikliğe etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir. Sertlik ve elastiklik üzerine depolama süresinin etkisi incelendiğinde ise ambalajlı örneklerin sertlik değerlerinin önemli bir değişime uğramadığı, elastiklik değerlerinin ise depolama sonunda ürünlerin genelinde düştüğü belirlenmiştir. Ambalajlanmamış kontrol örneğinde sertlik, peynirin kurumasiyla birlikte 20 günlük depolama süresince artmış ve 20. günde 0.08 N’a ulaşmıştır. Ambalajlamanın ürün tekstürünü korumadaki önemi, yaptığımız bu çalışmayla da ortaya konulmuştur.

Minas Frescal peyniri üzerine yapılan bir çalışmada ambalaj içi farklı gaz karışımları denenmiştir. Çalışma sonucunda, vakum, hava atmosferi ve farklı oranlarda CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> karışımı MAP ile ambalajlanan peynirlerin, bizim çalışmamızda da olduğu gibi, ambalaj içi gaz karışımının ve 21 günlük depolama süresinin ürün sertliğinde bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir (Silva vd., 2021). Başka bir çalışmada ise, vakum ambalajlanmış ürünlerin depolama sırasında ölçülen sertlik değerleri MAP ile ambalajlananlardan daha yüksek elde edilmiştir (Romani vd., 2002). Farklı ambalaj materyallerinin denendiği bir çalışmada, düşük yoğunluklu PE filmlerle ambalajlanan beyaz peynirlerin, polilaktik asit (PLA) filmlerden daha az nem kaybına uğradığı ve bu nedenle daha yumuşak yapıda kalabildiği bildirilmiştir (Li vd., 2018).

### **pH ve Titrasyon Asitliği**

Peynirlerde en önemli kalite kriterlerinden olan pH ve asitlik, peynirin aroması, tekstürü, kalan depolama süresi, mikrobiyal durumu gibi birçok konuda ön bilgi sağlamaktadır. Ambalajlama farklılıklarının, peynirin pH ve asitliği üzerine önemli etkisinin bulunacağı öngörülerek yapılmış olan analiz sonuçları Çizelge 2’de verilmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde tüm parametrelerin (ambalaj materyali, atmosfer ve depolama süresi) peynirin pH’sı üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Üretilen Hatay peynirinin depolama öncesi pH değeri 6.5 olarak ölçülmüştür ve bu değer depolama sırasında tüm uygulamalarda düşüş göstermiştir. Son analiz gününde ambalajlı örneklerin pH değerleri 6.1 – 6.5 arasında iken kontrol grubunun pH’sı 6.3 olarak ölçülmüştür. Çizelge 2’de verilen sonuçlar incelendiğinde PP/PA/EVOH/PE (M3) ile ambalajlamanın, pH değişimini engellediği ve vakum ambalajlama uygulamasının (VAK) pH’yı özellikle hava atmosferiyle ambalajlamaya göre daha iyi koruduğu tespit edilmiştir.

Peynirde meydana gelen asitlik gelişimi pıhtılaşma sırasında başlamakta ve olgunlaşma sırasında devam etmektedir. Laktozun mikroorganizmalar tarafından fermentasyonu sonucu oluşan laktik asit ve diğer asitler ile lipoliz sonucu oluşan yağ asitleri, peynirdeki titrasyon asitliğinin artmasına neden olmaktadır. Çalışma kapsamında üretilen Hatay peynirinin farklı ambalaj malzemesi ve farklı atmosferler içinde ambalajlanması sonucu titrasyon asitliği değerinde depolama süresince meydana gelen değişim Çizelge 2’de verilmiştir. Ambalaj malzemesinin, MAP’ın, depolama süresinin ve bu faktörlerin ikili üçlü etkileşimlerinin tamamının titrasyon asitliği üzerinde önemli bir etkisinin olduğu görülmektedir ( $P \leq 0.05$ ). Peynirin başlangıç titrasyon asitliği değeri, laktik asit cinsinden %0.2 olarak analiz edilmiştir. Depolama süresince tüm uygulamalarda asitlik artışı gözlenmiştir. Depolama sonunda en yüksek asitlik artışı kontrol örneklerinde tespit edilirken, onu tüm ambalaj malzemelerinin hava atmosfer uygulamaları (ATM) takip etmiştir. Depolama sonundaki en düşük asitlik değeri ise vakum ambalajlanan ürünlerde (VAK) ölçülmüştür.

Papaioannou vd. (2007)'nin Anthotryros peyniriyle yaptıkları çalışmada da, bizim sonuçlarımızda olduğu gibi, depolama süresince pH'nın tüm ürünlerde düştüğü, fakat bu düşüşün farklı oranlarda CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> ile ambalajlanan MAP uygulamasında vakumlu ürünlerden daha belirgin olduğu belirtilmiştir. Myzithra peynirinde yapılan bir çalışmada da yine bizim elde ettiğimiz sonuçlarda olduğu gibi, hava atmosferiyle ambalajlanan peynirlerin pH değerlerinin MAP ürünlerine göre daha hızlı düştüğü tespit edilmiş ve bu durumun, oksijen oranının yüksek olması nedeniyle hava atmosferinde hızlı gerçekleşen proteoliz ve lipoliz reaksiyonlarından kaynaklandığı belirtilmiştir (Dermiki vd., 2008). Pintado ve Malcata (2000) Requeijao peynirinde, Gonzalez-Fandos vd. (2000) Cameros peynirinde CO<sub>2</sub> gazının peynir pH'sında düşüşe sebep olduğunu belirtmişlerdir. Karbondioksitin, peynir yüzeyinde çözünerek karbonik aside dönüşmesi nedeniyle peynirin pH değerinde düşüş, titrasyon asitliğinde ise artış tespit edilmesinin beklenen bir sonuç olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar da bu tespiti doğrulamaktadır; MAP uygulamasıyla ambalajlanan Hatay peynirlerinin pH değerleri, vakum uygulanan peynirlerden daha hızlı düşmüştür.

### **Lipid Oksidasyonu**

Lipid oksidasyonu peynirlerin kalitesinin bozulmasında önemli bir faktördür ve oksidasyon sonucu oluşan kısa zincirli yağ asitleri, peynirde ransid tat oluşumundan sorumludur (Wolf vd., 2009). Oksidasyonun kontrolsüz hızda artışı, ürünün besin değerini olumsuz etkilemekte, duyuşal ve tekstürel kalite kayıplarına neden olmakta ve depolama süresini kısaltmaktadır. Oksidasyonun kontrolünde ise ambalaj materyalinin oksijen geçirgenliği ve ambalaj içindeki gaz kompozisyonu, depolama sıcaklığı ve süresi oldukça önemlidir.

Farklı ambalaj malzemeleri kullanılarak farklı atmosferlerde ambalajlanan peynirlerin depolama süresince gözlenen lipid oksidasyonu değişimleri mg MDA/kg cinsinden Çizelge 2'de verilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda, ambalaj materyali × MAP etkileşimi dışında tüm faktörlerin, ikili ve üçlü etkileşimlerinin TBARS değerleri üzerindeki

etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P \leq 0.05$ ). Peynir örneklerinde başlangıç TBARS değeri 0.3 mg MDA/kg olarak kaydedilmiş ve depolama süresince tüm uygulamalarda bu değer farklı düzeylerde artış gösterdiği belirlenmiştir. Depolama süresince en yüksek oksidasyon oranı, açıkta depolanan kontrol grubu örnekler ile yüksek gaz geçirgenliğine sahip M1 ambalaj malzemesi ve hava atmosferiyle ambalajlanan (ATM) grupta tespit edilmiştir. Bu durum PA/PE (M1)'nin yüksek oksijen geçirgenliği ve hava atmosferinde bulunan yüksek oksijen düzeyi ile ilişkilendirilmiştir. EVOH katmanlı M3 malzemesinin vakum ve CO<sub>2</sub>+N<sub>2</sub> (50:50) gaz karışımı içeren MAP uygulamalarında depolama sırasında lipid oksidasyonu daha iyi kontrol edilebilmiştir (Çizelge 2).

Farklı ambalaj materyallerinin krem peynirin oksidasyonuna etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, krem peyniri farklı derinliklerde PET/PE, PS/EVOH/PE, PP/PE termoform tabaklarda ambalajlanmış ve PET/AlO<sub>x</sub>/PE film ile ısı yapıştırma yapılmıştır. Farklı ambalajların derinlikleri ve farklı oksijen geçiş hızının oksidatif stabilite (TBARS) üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Pettersen vd., 2005). Ancak tabak ambalajlarda tam vakum yapılması teknolojik olarak mümkün olmayacağı için ambalajlama metodunun çok efektif olmadığı düşünülmektedir. Farklı ambalaj materyalleriyle peynirin raf ömrü üzerine yapılan bir başka çalışmada ise OTR'si yüksek ambalajların daha yüksek oranda oksidasyona neden olduğu kanıtlanmıştır (Piscopo vd., 2015).

### **Duyusal Kalite**

Ürünlerin duyuşal kalitesi depolama süresince test edilmiş ve sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir. Ambalajlanmamış olan kontrol grubu örneklerin depolama sırasında kuruması ve mikrobiyal açıdan da uygun olmayacağı öngörüsü nedeniyle 20. günden sonra tat değerlendirmesi yapılmamıştır. Derecelendirmede 9 puan üzerinden 5 ve üzerinde puan alan ürünler "kabul edilebilir" olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, tüm duyuşal nitelikler üzerinde depolama süresinin önemli ölçüde etkili olduğu belirlenmiştir ( $P \leq 0.05$ ).

## Ambalajlamanın Hatay peynirinin kalitesi ve raf ömrüne etkisi

Çizelge 2. Farklı ambalaj malzemesi ve atmosferde ambalajlanan Hatay peynirinin depolama süresince fizikokimyasal özellikleri

Table 2. Physicochemical properties of Hatay cheese packed in different packaging materials and atmospheres during storage

### Beyazlık İndeksi / Whiteness Index

| Ambalaj malzemesi / Packaging material | Ambalaj atmosferi / Packaging atmosphere | 0. gün / day 0                                | 5. gün / day 5          | 10. gün / day 10       | 20. gün / day 20        | 30. gün / day 30        | 45. gün / day 45        | 60. gün / day 60       |
|--|--|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
|  |  | Beyazlık İndeksi (WI)<br>Whiteness Index (WI) |                         |                        |                         |                         |                         |                        |
| Kontrol                                | Ambalajsız                               | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 80.4±2.3 <sup>Bb</sup>  | 75.3±2.7 <sup>Bd</sup> | 74.9±2.2 <sup>Bd</sup>  | 75.5±1.7 <sup>Cd</sup>  | 76.3±2.0 <sup>Bd</sup>  | 78.3±2.4 <sup>Bc</sup> |
| M1                                     | ATM                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.7±0.6 <sup>Abc</sup> | 84.0±0.9 <sup>Ab</sup> | 83.3±0.5 <sup>Ac</sup>  | 85.3±0.6 <sup>Ba</sup>  | 85.7±0.7 <sup>Aa</sup>  | 83.0±0.8 <sup>Ad</sup> |
|  | MAP                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.4±0.5 <sup>Ad</sup>  | 83.4±0.5 <sup>Ad</sup> | 83.9±0.6 <sup>Ac</sup>  | 85.3±0.3 <sup>Bb</sup>  | 85.5±0.7 <sup>Ab</sup>  | 82.9±0.5 <sup>Ae</sup> |
|  | VAK                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.5±0.4 <sup>Ab</sup>  | 83.5±0.7 <sup>Ab</sup> | 83.7±0.7 <sup>Ab</sup>  | 85.4±0.6 <sup>Ba</sup>  | 85.5±0.8 <sup>Aa</sup>  | 82.8±0.8 <sup>Ac</sup> |
| M2                                     | ATM                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.4±0.5 <sup>Ab</sup>  | 83.6±0.6 <sup>Ab</sup> | 83.6±0.4 <sup>Ab</sup>  | 85.5±0.7 <sup>ABa</sup> | 85.7±0.8 <sup>Aa</sup>  | 83.3±0.7 <sup>Ab</sup> |
|  | MAP                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.4±0.3 <sup>Abc</sup> | 83.8±0.6 <sup>Ab</sup> | 84.0±0.7 <sup>Ab</sup>  | 85.3±0.8 <sup>Ba</sup>  | 85.7±0.6 <sup>Aa</sup>  | 82.9±1.2 <sup>Ac</sup> |
|  | VAK                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.6±0.5 <sup>Ab</sup>  | 83.6±0.8 <sup>Ab</sup> | 83.9±0.9 <sup>Ab</sup>  | 86.2±0.5 <sup>Aa</sup>  | 85.8±1.0 <sup>Aa</sup>  | 82.9±0.7 <sup>Ac</sup> |
| M3                                     | ATM                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.3±0.3 <sup>Abc</sup> | 83.8±0.9 <sup>Ab</sup> | 83.5±0.9 <sup>Abc</sup> | 85.6±0.9 <sup>ABa</sup> | 85.3±0.6 <sup>Aa</sup>  | 83.0±0.8 <sup>Ac</sup> |
|  | MAP                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.4±0.6 <sup>Ac</sup>  | 83.4±0.4 <sup>Ac</sup> | 84.0±0.6 <sup>Ab</sup>  | 85.6±0.8 <sup>ABa</sup> | 85.6±0.4 <sup>Aa</sup>  | 83.0±0.6 <sup>Ac</sup> |
|  | VAK                                      | 85.9±0.4 <sup>Aa</sup>                        | 83.2±0.5 <sup>Ac</sup>  | 83.5±0.7 <sup>Ac</sup> | 83.4±0.9 <sup>Ac</sup>  | 85.1±0.5 <sup>Bb</sup>  | 85.6±0.7 <sup>ABa</sup> | 82.8±0.6 <sup>Ad</sup> |

M1: Koekstrude PA/PE M2: OPET/OPA/OPP M3: PP/PA/EVOH/PE ATM (hava atmosferi): %21 O<sub>2</sub> + %79 N<sub>2</sub> MAP: %50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub> VAK: Vakum

### Tekstür / Texture

| Ambalaj malzemesi / Packaging material | Ambalaj atmosferi / Packaging atmosphere | 0. gün / day 0                     | 5. gün / day 5            | 10. gün / day 10           | 20. gün / day 20         | 30. gün / day 30          | 45. gün / day 45          | 60. gün / day 60          |
|--|--|------------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|  |  | Sertlik (N)<br>Hardness (N)        |                           |                            |                          |                           |                           |                           |
| Kontrol                                | Ambalajsız                               | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>            | 0.06±0.03 <sup>ABb</sup>  | 0.08±0.01 <sup>Aa</sup>    | 0.08±0.01 <sup>Aa</sup>  |                           |                           |                           |
| M1                                     | ATM                                      | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>            | 0.07±0.03 <sup>Aa</sup>   | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>    | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup> | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.07±0.01 <sup>ABCa</sup> | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup>  |
|  | MAP                                      | 0.07±0.01 <sup>Aab</sup>           | 0.04±0.03 <sup>Bc</sup>   | 0.07±0.01 <sup>Aab</sup>   | 0.06±0.03 <sup>Bbc</sup> | 0.08±0.02 <sup>Ab</sup>   | 0.06±0.02 <sup>Dbc</sup>  | 0.08±0.02 <sup>Aa</sup>   |
|  | VAK                                      | 0.07±0.01 <sup>Aabc</sup>          | 0.06±0.03 <sup>ABc</sup>  | 0.08±0.01 <sup>Aab</sup>   | 0.07±0.02 <sup>Bbc</sup> | 0.08±0.01 <sup>Aabc</sup> | 0.08±0.01 <sup>ABa</sup>  | 0.08±0.02 <sup>ABbc</sup> |
| M2                                     | ATM                                      | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>            | 0.04±0.03 <sup>Bb</sup>   | 0.08±0.01 <sup>Aa</sup>    | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup> | 0.07±0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.08±0.01 <sup>ABCa</sup> | 0.08±0.02 <sup>Aa</sup>   |
|  | MAP                                      | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>            | 0.08±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.08±0.02 <sup>Aa</sup>    | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup> | 0.07±0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.08±0.01 <sup>ABa</sup>  | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup>  |
|  | VAK                                      | 0.07±0.01 <sup>Aab</sup>           | 0.07±0.02 <sup>Aab</sup>  | 0.07±0.02 <sup>Aab</sup>   | 0.06±0.03 <sup>Bb</sup>  | 0.07±0.01 <sup>Aab</sup>  | 0.08±0.01 <sup>ABa</sup>  | 0.06±0.03 <sup>Bb</sup>   |
| M3                                     | ATM                                      | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>            | 0.07±0.03 <sup>Aa</sup>   | 0.08±0.02 <sup>Aa</sup>    | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup> | 0.08±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.06±0.02 <sup>CDa</sup>  | 0.07±0.02 <sup>ABa</sup>  |
|  | MAP                                      | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>            | 0.07±0.03 <sup>Aa</sup>   | 0.08±0.02 <sup>Aa</sup>    | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup> | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.09±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.07±0.01 <sup>ABa</sup>  |
|  | VAK                                      | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>            | 0.07±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.07±0.02 <sup>Aa</sup>    | 0.07±0.02 <sup>ABa</sup> | 0.07±0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.07±0.02 <sup>BCDa</sup> | 0.07±0.02 <sup>ABa</sup>  |
|  |  | Elastiklik (mm)<br>Elasticity (mm) |                           |                            |                          |                           |                           |                           |
| Kontrol                                | Ambalajsız                               | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.09±0.01 <sup>Dc</sup>   | 0.18±0.07 <sup>ABb</sup>   | 0.30±0.06 <sup>Aa</sup>  |                           |                           |                           |
| M1                                     | ATM                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.12±0.03 <sup>CDa</sup>  | 0.12±0.04 <sup>CDa</sup>   | 0.12±0.03 <sup>Ba</sup>  | 0.13±0.06 <sup>Aa</sup>   | 0.10±0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.18±0.16 <sup>Aa</sup>   |
|  | MAP                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.09±0.04 <sup>Db</sup>   | 0.11±0.03 <sup>Db</sup>    | 0.10±0.02 <sup>Bb</sup>  | 0.12±0.03 <sup>Ab</sup>   | 0.11±0.02 <sup>Ab</sup>   | 0.12±0.03 <sup>Ab</sup>   |
|  | VAK                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.10±0.01 <sup>Dc</sup>   | 0.14±0.04 <sup>BCDbc</sup> | 0.11±0.02 <sup>Bc</sup>  | 0.11±0.02 <sup>Ac</sup>   | 0.12±0.02 <sup>Ac</sup>   | 0.18±0.09 <sup>Ab</sup>   |
| M2                                     | ATM                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.11±0.02 <sup>CDc</sup>  | 0.14±0.03 <sup>BCDbc</sup> | 0.11±0.03 <sup>Bc</sup>  | 0.12±0.03 <sup>Ac</sup>   | 0.12±0.03 <sup>Ac</sup>   | 0.18±0.14 <sup>Ab</sup>   |
|  | MAP                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.12±0.01 <sup>CDbc</sup> | 0.12±0.03 <sup>CDbc</sup>  | 0.13±0.03 <sup>Bbc</sup> | 0.11±0.03 <sup>Abc</sup>  | 0.10±0.01 <sup>Ac</sup>   | 0.13±0.03 <sup>Ab</sup>   |
|  | VAK                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.14±0.02 <sup>BCa</sup>  | 0.19±0.05 <sup>Aa</sup>    | 0.12±0.02 <sup>Ba</sup>  | 0.11±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.11±0.01 <sup>Aa</sup>   | 0.13±0.03 <sup>Aa</sup>   |
| M3                                     | ATM                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.15±0.04 <sup>Ba</sup>   | 0.17±0.06 <sup>ABCa</sup>  | 0.10±0.02 <sup>Ba</sup>  | 0.11±0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.11±0.03 <sup>Aa</sup>   | 0.11±0.01 <sup>Aa</sup>   |
|  | MAP                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.14±0.03 <sup>BCbc</sup> | 0.11±0.01 <sup>Dc</sup>    | 0.11±0.02 <sup>Bbc</sup> | 0.13±0.01 <sup>Abc</sup>  | 0.10±0.02 <sup>Ac</sup>   | 0.15±0.05 <sup>Ab</sup>   |
|  | VAK                                      | 0.26±0.06 <sup>Aa</sup>            | 0.19±0.08 <sup>Aa</sup>   | 0.13±0.02 <sup>BCDa</sup>  | 0.12±0.02 <sup>Ba</sup>  | 0.12±0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.12±0.02 <sup>Aa</sup>   | 0.12±0.03 <sup>Aa</sup>   |

M1: Koekstrude PA/PE M2: OPET/OPA/OPP M3: PP/PA/EVOH/PE ATM (hava atmosferi): %21 O<sub>2</sub> + %79 N<sub>2</sub> MAP: %50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub> VAK: Vakum

pH ve Titrasyon Asitliği *pH and Titration Acidity*

| Ambalaj malzemesi         | Ambalaj atmosferi           | 0. gün                  | 5. gün                   | 10. gün                  | 20. gün                  | 30. gün                   | 45. gün                  | 60. gün                 |
|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Packaging material</i> | <i>Packaging atmosphere</i> | <i>day 0</i>            | <i>day 5</i>             | <i>day 10</i>            | <i>day 20</i>            | <i>day 30</i>             | <i>day 45</i>            | <i>day 60</i>           |
|                           |                             | pH <i>pH</i>            |                          |                          |                          |                           |                          |                         |
| Kontrol                   | Ambalajsız                  | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.02 <sup>BCa</sup>  | 6.3±0.01 <sup>Cb</sup>   | 6.3±0.01 <sup>Dcd</sup>  | 6.3±0.03 <sup>BCc</sup>   | 6.3±0.02 <sup>BCcd</sup> | 6.3±0.02 <sup>Dd</sup>  |
| M1                        | ATM                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.02 <sup>ABa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.4±0.01 <sup>Bb</sup>   | 6.4±0.04 <sup>ABb</sup>   | 6.2±0.02 <sup>Cc</sup>   | 6.1±0.04 <sup>Fd</sup>  |
|                           | MAP                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>Ca</sup>   | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.4±0.14 <sup>ABb</sup>   | 6.4±0.04 <sup>ABab</sup> | 6.3±0.03 <sup>Cb</sup>  |
|                           | VAK                         | 6.5±0.03 <sup>ABa</sup> | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.5±0.01 <sup>ABab</sup> | 6.5±0.01 <sup>Ac</sup>   | 6.5±0.04 <sup>Abc</sup>   | 6.4±0.03 <sup>Ac</sup>   | 6.4±0.02 <sup>Cd</sup>  |
| M2                        | ATM                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.5±0.01 <sup>ABa</sup>  | 6.3±0.02 <sup>Db</sup>   | 6.2±0.21 <sup>Cbc</sup>   | 6.1±0.10 <sup>Dc</sup>   | 6.2±0.05 <sup>Ebc</sup> |
|                           | MAP                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>BCab</sup> | 6.5±0.01 <sup>Bab</sup>  | 6.4±0.01 <sup>Babc</sup> | 6.3±0.23 <sup>BCbcd</sup> | 6.2±0.27 <sup>Ccd</sup>  | 6.1±0.03 <sup>Gd</sup>  |
|                           | VAK                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.5±0.03 <sup>Ba</sup>   | 6.4±0.01 <sup>Bab</sup>  | 6.3±0.16 <sup>BCb</sup>   | 6.4±0.03 <sup>Aa</sup>   | 6.5±0.02 <sup>Aa</sup>  |
| M3                        | ATM                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.02 <sup>Aa</sup>   | 6.5±0.03 <sup>ABa</sup>  | 6.3±0.04 <sup>Dc</sup>   | 6.4±0.08 <sup>ABb</sup>   | 6.2±0.06 <sup>CDd</sup>  | 6.3±0.02 <sup>Cc</sup>  |
|                           | MAP                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.5±0.03 <sup>ABa</sup>  | 6.5±0.02 <sup>Ab</sup>   | 6.3±0.18 <sup>ABb</sup>   | 6.5±0.00 <sup>Aab</sup>  | 6.5±0.01 <sup>Aab</sup> |
|                           | VAK                         | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>BCa</sup>  | 6.5±0.01 <sup>ABa</sup>  | 6.5±0.02 <sup>Aab</sup>  | 6.5±0.03 <sup>Aa</sup>    | 6.5±0.01 <sup>Aa</sup>   | 6.4±0.01 <sup>Bb</sup>  |

|         |            |   |                         |                         |                          |                         |                          |                         |
|---------|------------|---|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|         |            | Titrasyon Asitliği (% Laktik Asit) <i>Titration Acidity (Lactic Acid %)</i> |                         |                         |                          |                         |                          |                         |
| Kontrol | Ambalajsız | 0.2±0.00 <sup>Ac</sup>  | 0.4±0.02 <sup>Aab</sup> | 0.3±0.02 <sup>Ab</sup>  | 0.4±0.01 <sup>Aab</sup>  | 0.4±0.06 <sup>Aab</sup> | 0.4±0.01 <sup>Aab</sup>  | 0.4±0.03 <sup>Aa</sup>  |
| M1      | ATM        | 0.2±0.00 <sup>Ad</sup>  | 0.2±0.02 <sup>CDc</sup> | 0.2±0.00 <sup>Cc</sup>  | 0.2±0.01 <sup>Ec</sup>   | 0.3±0.04 <sup>Bb</sup>  | 0.3±0.01 <sup>CDb</sup>  | 0.3±0.01 <sup>Ca</sup>  |
|         | MAP        | 0.2±0.00 <sup>Ac</sup>  | 0.2±0.01 <sup>Dc</sup>  | 0.2±0.01 <sup>Bc</sup>  | 0.2±0.01 <sup>DEc</sup>  | 0.3±0.02 <sup>Bb</sup>  | 0.3±0.01 <sup>CDab</sup> | 0.3±0.02 <sup>Da</sup>  |
|         | VAK        | 0.2±0.00 <sup>Ac</sup>  | 0.3±0.00 <sup>Ba</sup>  | 0.2±0.01 <sup>Bc</sup>  | 0.2±0.00 <sup>Ed</sup>   | 0.3±0.01 <sup>Ba</sup>  | 0.3±0.02 <sup>CDa</sup>  | 0.3±0.01 <sup>Dab</sup> |
| M2      | ATM        | 0.2±0.00 <sup>Ad</sup>  | 0.2±0.01 <sup>CDc</sup> | 0.2±0.00 <sup>Bc</sup>  | 0.3±0.01 <sup>CDc</sup>  | 0.3±0.02 <sup>Bb</sup>  | 0.3±0.01 <sup>Cb</sup>   | 0.3±0.04 <sup>BCa</sup> |
|         | MAP        | 0.2±0.00 <sup>Af</sup>  | 0.3±0.01 <sup>Bc</sup>  | 0.2±0.01 <sup>BCc</sup> | 0.3±0.01 <sup>Cd</sup>   | 0.3±0.02 <sup>Ab</sup>  | 0.3±0.02 <sup>Bb</sup>   | 0.4±0.01 <sup>Ba</sup>  |
|         | VAK        | 0.2±0.00 <sup>Ad</sup>  | 0.3±0.00 <sup>Cb</sup>  | 0.2±0.01 <sup>BCc</sup> | 0.3±0.00 <sup>Ca</sup>   | 0.3±0.01 <sup>Ba</sup>  | 0.3±0.00 <sup>Da</sup>   | 0.3±0.01 <sup>Dab</sup> |
| M3      | ATM        | 0.2±0.00 <sup>Ad</sup>  | 0.3±0.00 <sup>Bab</sup> | 0.2±0.01 <sup>BCc</sup> | 0.3±0.02 <sup>Bb</sup>   | 0.3±0.01 <sup>Bb</sup>  | 0.3±0.01 <sup>CDb</sup>  | 0.3±0.01 <sup>Ca</sup>  |
|         | MAP        | 0.2±0.00 <sup>Ac</sup>  | 0.3±0.03 <sup>Cab</sup> | 0.2±0.01 <sup>Bb</sup>  | 0.3±0.02 <sup>CDab</sup> | 0.3±0.02 <sup>Bab</sup> | 0.3±0.02 <sup>Dab</sup>  | 0.3±0.01 <sup>Da</sup>  |
|         | VAK        | 0.2±0.00 <sup>Ac</sup>  | 0.2±0.01 <sup>CDb</sup> | 0.2±0.01 <sup>BCb</sup> | 0.3±0.02 <sup>Ca</sup>   | 0.3±0.02 <sup>Ba</sup>  | 0.3±0.02 <sup>Da</sup>   | 0.3±0.01 <sup>Da</sup>  |

M1: Koekstrude PA/PE M2: OPET/OPA/OPP M3: PP/PA/EVOH/PE ATM (hava atmosferi): %21 O<sub>2</sub> + %79 N<sub>2</sub> MAP: %50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub> VAK: Vakum

Lipid Oksidasyonu *Lipid Oxidation*

| Ambalaj malzemesi         | Ambalaj atmosferi           | 0. gün                                     | 5. gün                  | 10. gün                 | 20. gün                  | 30. gün                  | 45. gün                  | 60. gün                 |
|---------------------------|-----------------------------|--|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>Packaging material</i> | <i>Packaging atmosphere</i> | <i>day 0</i>                               | <i>day 5</i>            | <i>day 10</i>           | <i>day 20</i>            | <i>day 30</i>            | <i>day 45</i>            | <i>day 60</i>           |
|                           |                             | TBARS (mg MDA/kg) <i>TBARS (mg MDA/kg)</i> |                         |                         |                          |                          |                          |                         |
| Kontrol                   | Ambalajsız                  | 0.3±0.04 <sup>Ad</sup>                     | 0.6±0.03 <sup>Abc</sup> | 0.5±0.05 <sup>Bc</sup>  | 0.6±0.02 <sup>Ab</sup>   | 0.7±0.06 <sup>Aa</sup>   | 0.7±0.05 <sup>Aa</sup>   | 0.7±0.03 <sup>ABa</sup> |
| M1                        | ATM                         | 0.3±0.04 <sup>Ae</sup>                     | 0.4±0.10 <sup>BCd</sup> | 0.6±0.02 <sup>Bc</sup>  | 0.5±0.03 <sup>CDcd</sup> | 0.7±0.03 <sup>Ab</sup>   | 0.8±0.12 <sup>Aab</sup>  | 0.8±0.10 <sup>Aa</sup>  |
|                           | MAP                         | 0.3±0.04 <sup>Ad</sup>                     | 0.5±0.02 <sup>BCc</sup> | 0.6±0.04 <sup>Ab</sup>  | 0.6±0.03 <sup>Ab</sup>   | 0.7±0.03 <sup>Aa</sup>   | 0.6±0.03 <sup>Bb</sup>   | 0.6±0.04 <sup>Cb</sup>  |
|                           | VAK                         | 0.3±0.04 <sup>Ae</sup>                     | 0.4±0.05 <sup>Cd</sup>  | 0.6±0.03 <sup>Bbc</sup> | 0.6±0.03 <sup>DBb</sup>  | 0.6±0.03 <sup>Cbc</sup>  | 0.5±0.01 <sup>CDc</sup>  | 0.7±0.05 <sup>Ba</sup>  |
| M2                        | ATM                         | 0.3±0.04 <sup>Ab</sup>                     | 0.3±0.04 <sup>Fb</sup>  | 0.6±0.03 <sup>Ba</sup>  | 0.5±0.03 <sup>Ca</sup>   | 0.6±0.02 <sup>BCa</sup>  | 0.6±0.02 <sup>Ca</sup>   | 0.6±0.14 <sup>Da</sup>  |
|                           | MAP                         | 0.3±0.04 <sup>Ad</sup>                     | 0.5±0.04 <sup>Bc</sup>  | 0.5±0.03 <sup>Bb</sup>  | 0.6±0.01 <sup>BCb</sup>  | 0.6±0.06 <sup>Ba</sup>   | 0.6±0.03 <sup>CDab</sup> | 0.5±0.01 <sup>EFc</sup> |
|                           | VAK                         | 0.3±0.04 <sup>Ae</sup>                     | 0.4±0.02 <sup>DEd</sup> | 0.5±0.04 <sup>Cbc</sup> | 0.5±0.03 <sup>Ec</sup>   | 0.5±0.03 <sup>DEab</sup> | 0.5±0.07 <sup>EFbc</sup> | 0.5±0.03 <sup>DEa</sup> |
| M3                        | ATM                         | 0.3±0.04 <sup>Ad</sup>                     | 0.4±0.05 <sup>Dc</sup>  | 0.4±0.05 <sup>Cb</sup>  | 0.5±0.03 <sup>EDab</sup> | 0.5±0.02 <sup>DEa</sup>  | 0.5±0.04 <sup>CDa</sup>  | 0.5±0.05 <sup>EFa</sup> |
|                           | MAP                         | 0.3±0.04 <sup>Ac</sup>                     | 0.3±0.02 <sup>EFc</sup> | 0.5±0.08 <sup>Cb</sup>  | 0.5±0.09 <sup>Ca</sup>   | 0.6±0.03 <sup>CDa</sup>  | 0.5±0.03 <sup>DEab</sup> | 0.5±0.04 <sup>Fb</sup>  |
|                           | VAK                         | 0.3±0.04 <sup>Ad</sup>                     | 0.3±0.03 <sup>Fd</sup>  | 0.4±0.02 <sup>Cb</sup>  | 0.4±0.06 <sup>Fc</sup>   | 0.5±0.03 <sup>Eb</sup>   | 0.5±0.04 <sup>Fb</sup>   | 0.5±0.05 <sup>DEa</sup> |

M1: Koekstrude PA/PE M2: OPET/OPA/OPP M3: PP/PA/EVOH/PE ATM (hava atmosferi): %21 O<sub>2</sub> + %79 N<sub>2</sub> MAP: %50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub> VAK: Vakum

Aynı sütunda, verilen depolama gününde, aynı büyük harfe sahip uygulamalar arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Aynı satırda, verilen uygulamada aynı küçük harfe sahip depolama süreleri arasında istatistiksel açıdan fark yoktur ( $P > 0.05$ ). *There is no statistical difference between applications with the same capital letter in the same column on a given storage day ( $P > 0.05$ ). There is no statistical difference between the storage times with the same lowercase letter in the same line ( $P > 0.05$ ).*

Renk açısından peynir örnekleri en yüksek puanı 0. günde almış olup depolama süresince renk kalitesi azalmıştır. Renkteki en büyük kalite kaybı kontrol grubunda ortaya çıkmıştır ve bu örnekler 20. günden sonra kabul edilebilir limitin altında bulunmuştur. Ambalaj materyali ve ambalaj içi gaz karışımı, rengi etkilememiş olup, ambalajlı ürünlerde rengine etki eden tek faktörün depolama süresi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Depolamanın sonunda tüm ambalajlı uygulamalar 7.0-7.8 puan alırken, kontrol grubu örnekleri 3.0 puan almıştır.

Duyusal analiz kapsamında dilimlenmiş peynirde tekstürel olarak, özellikle depolama boyunca meydana gelen yumuşama ve yapışkan yapı varlığı belirlenmeye çalışılmıştır. Duyusal nitelikler arasında ambalajlı örnekler ile kontrol grubu kıyaslandığında en büyük farklılık tekstürde tespit edilmiştir (Çizelge 3). Açıkta depolanan kontrol grubu örnekler hızla sertleşerek depolamanın 5. gününde yapılan analizde tekstürel açıdan kabul edilebilir limitin altına düşmüştür. Depolamanın ilk 45 gününde ambalaj materyali ve ambalajlama yöntemi ürünün tekstürünü etkilememiş olup, son analiz gününde (60. gün) gaz geçirgenliği diğer ambalajlardan yüksek olan koekstrüde PA/PE materyali ile hava atmosferinde ambalajlanan peynir (M1-ATM), diğer ambalajlı ürünlerden daha düşük puan almıştır.

Tat değerlendirmesinde ise özellikle oksidasyona bağlı ransid tat oluşumu belirlenmeye çalışılmıştır. Ambalajsız olarak depolanan kontrol grubu peynirler tat açısından 10. günden sonra kabul edilebilir limitin altına düşmüştür. Ambalajlı peynirlerden EVOH bariyerli ve vakumlu ambalajlar (M3-VAK) dışındaki tüm ürünlerin tat puanları depolama boyunca azalmıştır. M3-VAK ürünüde raf ömrü boyunca tat farklılığı gözlenmemiştir. Diğer ambalajlı ürünlerde ise, depolamayla tat puanları düşse de, 60 günlük depolama süresince tüm ambalajlı ürünler “kabul edilebilir” limitin üzerinde bulunmuştur. Hava atmosferinde ambalajlanan ürünler vakum ve MAP uygulanan ürünlerden daha düşük puan almıştır.

Genel ürün beğenisinde tüm ürün nitelikleri birlikte değerlendirilerek panelistlerin ürün hakkındaki beğeni dereceleri hedonik skala ile belirlenmiştir. Genel ürün beğenisi diğer duyuşal niteliklerle uyumludur; depolamayla genel beğeni azalmıştır. Kontrol örnekleri 60. günde 2.1 puan alırken, ambalajlı örnekler 6.7-7.8 arasında puanlar almıştır. Bu farklılık Hatay peynirinin duyuşal kalitesini korumada ambalajlamanın önemini ortaya koymuştur. Son analiz gününe kadar ambalajlı örnekler arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Son analiz gününde ise ATM uygulaması, MAP ve VAK uygulamalarına kıyasla daha düşük puanlar almıştır. Depolama süresince genel ürün beğenisi açısından en başarılı uygulama M3-VAK uygulaması olmuştur.

San Simón da Costa peyniri ile yapılan bir çalışmada benzer şekilde tat ve genel ürün beğenisinde ambalajsız kontrol grubuna ve MAP uygulanan peynirlere kıyasla en iyi sonuçlar vakum ambalaj uygulamasında kaydedilmiştir (Garabal vd., 2010). Peynirin MAP ile ambalajlanmasında %100 CO<sub>2</sub> uygulamasının ekşimsi tada neden olduğu belirlenmiş ve peynirlerin mikrobiyal güvenliğini sağlarken duyuşal kalitesini de koruyabilmek için karbondioksitin azot ile karıştırılması gerektiği belirtilmiştir (Erkan ve Aksu, 2006). Lamine edilmiş PE/PA termofor ambalajın kullanıldığı bir MAP çalışmasında farklı oranlarda CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> atmosferleri ile ambalajlanan peynirler için %100 CO<sub>2</sub> kullanımının tekstürel açıdan da uygun olmadığı, peyniri kırılğan ve ekşi hale getirdiği belirlenmiştir (Juric vd., 2003). Hotchkiss vd. (2006), peynirlerin duyuşal özelliklerinin korunması için en uygun gaz konsantrasyonunun yüksek miktarda azot (>%50) içermesi gerektiğini vurgulamıştır. Myzithra peynirinde yapılan çalışmada da peynirin duyuşal özelliklerinin korunması için oksijen içermeyen MAP uygulamasının, aerobik ambalajlamaya göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Dermiki vd., 2008). Graviera peynirinde de en iyi duyuşal sonuçlar %100 N<sub>2</sub> ve %50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub> gaz karışımlarıyla ambalajlanmış örneklerde tespit edilmiştir (Trobetas vd., 2008).

Çizelge 3. Farklı ambalaj malzemesi ve atmosferde ambalajlanan Hatay peynirinde depolama süresince duyuşsal nitelikler

Table 3. Sensory attributes during storage in Hatay cheese packaged in different packaging materials and atmospheres

|   |   | Renk Color                             |                         |                         |                         |                        |                         |                           |                        |
|---|---|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|
| Ambalaj malzemesi<br>Packaging material | Ambalaj atmosferi<br>Packaging atmosphere | 0. gün<br>day 0                        | 5. gün<br>day 5         | 10. gün<br>day 10       | 20. gün<br>day 20       | 30. gün<br>day 30      | 45. gün<br>day 45       | 60. gün<br>day 60         |                        |
| Kontrol                                 | Ambalajsız                                | 8.4±0.7 <sup>Aa</sup>                  | 7.0±1.2 <sup>Bb</sup>   | 6.4±1.3 <sup>Bb</sup>   | 5.1±1.5 <sup>Bb</sup>   | 4.0±2.1 <sup>Bcd</sup> | 4.2±2.4 <sup>Bcd</sup>  | 3.0±1.7 <sup>Cd</sup>     |                        |
|   | M1  | ATM                                    | 8.3±0.9 <sup>Aa</sup>   | 8.0±1.4 <sup>Aa</sup>   | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>   | 7.8±0.9 <sup>Aab</sup> | 7.6±0.8 <sup>Aab</sup>  | 7.7±0.9 <sup>Aab</sup>    | 7.0±0.6 <sup>Bb</sup>  |
|   | MAP                                       | 8.6±0.5 <sup>Aa</sup>                  | 8.2±0.7 <sup>Aab</sup>  | 8.0±0.9 <sup>Aabc</sup> | 7.6±0.8 <sup>Abc</sup>  | 7.3±0.9 <sup>Ac</sup>  | 7.3±1.0 <sup>Ac</sup>   | 7.5±0.5 <sup>ABc</sup>    |                        |
| M2                                      | VAK                                       | 8.3±0.8 <sup>Aa</sup>                  | 7.9±0.8 <sup>ABab</sup> | 8.0±1.0 <sup>Ab</sup>   | 7.5±1.0 <sup>Ab</sup>   | 7.3±0.8 <sup>Ab</sup>  | 7.3±0.8 <sup>Ab</sup>   | 7.4±0.9 <sup>ABb</sup>    |                        |
|   | ATM                                       | 8.3±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.8±1.4 <sup>ABab</sup> | 8.3±0.6 <sup>Aa</sup>   | 7.7±0.8 <sup>Aab</sup>  | 7.5±0.8 <sup>Ab</sup>  | 7.5±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.2±0.6 <sup>ABb</sup>    |                        |
|   | MAP                                       | 8.6±0.5 <sup>Aa</sup>                  | 7.8±1.0 <sup>ABbc</sup> | 8.3±0.8 <sup>Aab</sup>  | 7.9±0.9 <sup>Abc</sup>  | 7.4±0.8 <sup>Ac</sup>  | 7.4±0.8 <sup>Ac</sup>   | 7.4±0.5 <sup>ABc</sup>    |                        |
| M3                                      | VAK                                       | 8.3±0.8 <sup>Aa</sup>                  | 8.2±0.9 <sup>Aa</sup>   | 8.2±0.8 <sup>Aa</sup>   | 8.0±0.7 <sup>Aa</sup>   | 7.3±0.7 <sup>Ab</sup>  | 7.2±0.7 <sup>Ab</sup>   | 7.6±0.9 <sup>ABab</sup>   |                        |
|   | ATM                                       | 8.3±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 8.1±0.8 <sup>Aa</sup>   | 8.3±0.9 <sup>Aa</sup>   | 7.8±0.7 <sup>Aab</sup>  | 7.3±0.9 <sup>Ab</sup>  | 7.7±0.9 <sup>Ab</sup>   | 7.3±0.5 <sup>ABb</sup>    |                        |
|   | MAP                                       | 8.6±0.5 <sup>Aa</sup>                  | 7.8±1.1 <sup>ABbc</sup> | 8.1±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.8±0.6 <sup>Abc</sup>  | 7.4±0.7 <sup>Ac</sup>  | 7.3±0.9 <sup>Ac</sup>   | 7.3±0.6 <sup>ABc</sup>    |                        |
| VAK                                     | 8.3±0.8 <sup>Aa</sup>                     | 7.8±1.1 <sup>ABab</sup>                | 8.1±0.7 <sup>Aab</sup>  | 7.7±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.5±0.7 <sup>Ab</sup>   | 7.6±0.8 <sup>Aab</sup> | 7.8±0.8 <sup>Ab</sup>   |                           |                        |
|   |   | Tekstür Texture                        |                         |                         |                         |                        |                         |                           |                        |
| Ambalaj malzemesi<br>Packaging material | Ambalaj atmosferi<br>Packaging atmosphere | 0. gün<br>day 0                        | 5. gün<br>day 5         | 10. gün<br>day 10       | 20. gün<br>day 20       | 30. gün<br>day 30      | 45. gün<br>day 45       | 60. gün<br>day 60         |                        |
| Kontrol                                 | Ambalajsız                                | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 3.5±1.6 <sup>Bb</sup>   | 3.3±1.1 <sup>Bb</sup>   | 2.7±1.4 <sup>Bbc</sup>  | 1.9±1.0 <sup>Bcd</sup> | 1.6±1.0 <sup>Bd</sup>   | 1.3±0.5 <sup>Cd</sup>     |                        |
|   | M1  | ATM                                    | 8.2±0.9 <sup>Aa</sup>   | 7.8±0.9 <sup>Aa</sup>   | 8.0±1.1 <sup>Aa</sup>   | 7.9±0.8 <sup>Aa</sup>  | 7.6±0.9 <sup>Aa</sup>   | 7.6±1.1 <sup>Aa</sup>     | 6.7±0.9 <sup>Bb</sup>  |
|   | MAP                                       | 8.4±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.9±0.9 <sup>Aab</sup>  | 8.5±0.5 <sup>Aa</sup>   | 7.7±1.1 <sup>Ab</sup>   | 7.5±0.8 <sup>Ab</sup>  | 7.8±0.7 <sup>Aab</sup>  | 7.4±0.5 <sup>Ab</sup>     |                        |
| M2                                      | VAK                                       | 8.3±1.1 <sup>Aa</sup>                  | 7.9±0.8 <sup>Aab</sup>  | 8.2±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.3±0.9 <sup>Ab</sup>   | 7.4±1.1 <sup>Ab</sup>  | 7.5±1.3 <sup>Aab</sup>  | 7.3±0.8 <sup>Ab</sup>     |                        |
|   | ATM                                       | 8.2±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.5±1.2 <sup>Aa</sup>   | 8.0±1.0 <sup>Aa</sup>   | 7.5±1.0 <sup>Aa</sup>   | 7.5±1.1 <sup>Aa</sup>  | 7.6±1.2 <sup>Aa</sup>   | 7.3±0.5 <sup>ABa</sup>    |                        |
|   | MAP                                       | 8.4±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.7±1.2 <sup>Aabc</sup> | 8.3±0.7 <sup>Aab</sup>  | 7.9±1.0 <sup>Aabc</sup> | 7.3±1.2 <sup>Ac</sup>  | 7.5±1.0 <sup>Abc</sup>  | 7.3±0.8 <sup>Ac</sup>     |                        |
| M3                                      | VAK                                       | 8.3±1.1 <sup>Aa</sup>                  | 7.5±1.7 <sup>Aab</sup>  | 7.9±1.5 <sup>Aab</sup>  | 7.9±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.4±1.1 <sup>Aab</sup> | 7.5±1.3 <sup>Aab</sup>  | 7.0±0.6 <sup>ABb</sup>    |                        |
|   | ATM                                       | 8.2±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.6±1.2 <sup>Aab</sup>  | 8.1±1.0 <sup>Aa</sup>   | 7.9±1.2 <sup>Aa</sup>   | 7.5±1.0 <sup>Aab</sup> | 7.5±1.0 <sup>Aab</sup>  | 6.9±0.7 <sup>ABb</sup>    |                        |
|   | MAP                                       | 8.4±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.6±1.2 <sup>Aab</sup>  | 8.1±0.5 <sup>Aa</sup>   | 7.8±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.5±1.2 <sup>Aab</sup> | 7.9±1.2 <sup>Aa</sup>   | 7.0±0.9 <sup>ABb</sup>    |                        |
| VAK                                     | 8.3±1.1 <sup>Aa</sup>                     | 8.0±0.7 <sup>Aab</sup>                 | 8.0±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.8±1.3 <sup>Aab</sup>  | 7.7±1.2 <sup>Aab</sup>  | 8.0±0.9 <sup>Aab</sup> | 7.4±0.8 <sup>Ab</sup>   |                           |                        |
|   |   | Tat Taste                              |                         |                         |                         |                        |                         |                           |                        |
| Ambalaj malzemesi<br>Packaging material | Ambalaj atmosferi<br>Packaging atmosphere | 0. gün<br>day 0                        | 5. gün<br>day 5         | 10. gün<br>day 10       | 20. gün<br>day 20       | 30. gün<br>day 30      | 45. gün<br>day 45       | 60. gün<br>day 60         |                        |
| Kontrol                                 | Ambalajsız                                | 8.3±0.7 <sup>Aa</sup>                  | 5.2±1.0 <sup>Bb</sup>   | 5.3±1.3 <sup>Cb</sup>   | 3.1±1.7 <sup>Bc</sup>   |                        |                         |                           |                        |
|   | M1  | ATM                                    | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>   | 7.5±1.2 <sup>Aab</sup>  | 7.8±0.7 <sup>ABa</sup>  | 7.6±0.9 <sup>Aa</sup>  | 7.7±1.1 <sup>Aa</sup>   | 8.0±1.1 <sup>Aa</sup>     | 6.8±0.9 <sup>CDb</sup> |
|   | MAP                                       | 8.4±0.7 <sup>Aa</sup>                  | 7.8±0.6 <sup>Aab</sup>  | 7.8±0.6 <sup>ABab</sup> | 7.7±0.9 <sup>Ab</sup>   | 7.6±0.8 <sup>Ab</sup>  | 7.9±0.7 <sup>Aab</sup>  | 7.8±0.6 <sup>ABb</sup>    |                        |
| M2                                      | VAK                                       | 8.3±0.6 <sup>Aa</sup>                  | 7.4±0.9 <sup>Ab</sup>   | 7.9±0.9 <sup>ABab</sup> | 7.3±0.7 <sup>Ab</sup>   | 7.6±1.0 <sup>Ab</sup>  | 7.8±1.2 <sup>Aab</sup>  | 7.8±0.6 <sup>ABab</sup>   |                        |
|   | ATM                                       | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 7.7±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.5±0.7 <sup>ABab</sup> | 7.1±0.5 <sup>Abc</sup>  | 7.5±1.1 <sup>Aab</sup> | 7.5±1.4 <sup>Aab</sup>  | 6.4±0.7 <sup>Dc</sup>     |                        |
|   | MAP                                       | 8.4±0.7 <sup>Aa</sup>                  | 7.3±0.9 <sup>Abc</sup>  | 8.1±0.7 <sup>ABab</sup> | 7.5±0.9 <sup>Abc</sup>  | 7.3±1.3 <sup>Abc</sup> | 7.4±1.1 <sup>Abc</sup>  | 6.8±0.8 <sup>CDc</sup>    |                        |
| M3                                      | VAK                                       | 8.3±0.6 <sup>Aa</sup>                  | 7.7±1.0 <sup>Aab</sup>  | 7.4±1.0 <sup>Bb</sup>   | 7.8±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.5±0.8 <sup>Ab</sup>  | 7.8±0.6 <sup>Aab</sup>  | 7.1±1.4 <sup>BCDc</sup>   |                        |
|   | ATM                                       | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 7.7±1.1 <sup>Aab</sup>  | 8.1±0.7 <sup>ABab</sup> | 7.3±0.9 <sup>Ab</sup>   | 7.6±0.8 <sup>Ab</sup>  | 7.8±0.8 <sup>Aab</sup>  | 6.6±1.4 <sup>CDc</sup>    |                        |
|   | MAP                                       | 8.4±0.7 <sup>Aa</sup>                  | 7.5±1.2 <sup>Ac</sup>   | 8.3±0.6 <sup>Aab</sup>  | 7.3±0.8 <sup>Ac</sup>   | 7.5±0.8 <sup>Ac</sup>  | 7.7±0.8 <sup>Abc</sup>  | 7.4±1.1 <sup>ABCc</sup>   |                        |
| VAK                                     | 8.3±0.6 <sup>Aa</sup>                     | 7.8±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.9±0.8 <sup>ABa</sup>  | 7.5±1.3 <sup>Aa</sup>   | 7.8±1.0 <sup>Aa</sup>   | 8.1±0.8 <sup>Aa</sup>  | 8.2±1.0 <sup>Aa</sup>   |                           |                        |
|   |   | Genel Ürün Beğenisi Overall acceptance |                         |                         |                         |                        |                         |                           |                        |
| Ambalaj malzemesi<br>Packaging material | Ambalaj atmosferi<br>Packaging atmosphere | 0. gün<br>day 0                        | 5. gün<br>day 5         | 10. gün<br>day 10       | 20. gün<br>day 20       | 30. gün<br>day 30      | 45. gün<br>day 45       | 60. gün<br>day 60         |                        |
| Kontrol                                 | Ambalajsız                                | 8.1±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 4.8±1.5 <sup>Bb</sup>   | 5.2±1.0 <sup>Bab</sup>  | 3.3±1.3 <sup>Bb</sup>   | 2.3±1.0 <sup>Bb</sup>  | 2.3±1.0 <sup>Bb</sup>   | 2.1±1.2 <sup>Eb</sup>     |                        |
|   | M1  | ATM                                    | 8.2±0.9 <sup>Aa</sup>   | 7.7±1.2 <sup>Aa</sup>   | 8.1±0.9 <sup>Aa</sup>   | 7.8±0.6 <sup>Aa</sup>  | 7.6±0.9 <sup>Aa</sup>   | 7.7±1.0 <sup>Aa</sup>     | 6.8±0.8 <sup>CDb</sup> |
|   | MAP                                       | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 8.0±0.7 <sup>Aab</sup>  | 8.0±0.0 <sup>Aab</sup>  | 7.6±0.8 <sup>Ab</sup>   | 7.5±0.8 <sup>Ab</sup>  | 7.8±0.8 <sup>Aab</sup>  | 7.5±0.5 <sup>ABCb</sup>   |                        |
| M2                                      | VAK                                       | 8.0±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 7.9±0.9 <sup>Aab</sup>  | 8.2±0.8 <sup>Aa</sup>   | 7.3±0.8 <sup>Ab</sup>   | 7.5±0.9 <sup>Aab</sup> | 7.5±1.3 <sup>Aab</sup>  | 7.7±0.5 <sup>ABab</sup>   |                        |
|   | ATM                                       | 8.2±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.7±1.1 <sup>Aa</sup>   | 8.0±0.7 <sup>Aa</sup>   | 7.3±0.7 <sup>Ab</sup>   | 7.6±1.1 <sup>Aab</sup> | 7.5±1.3 <sup>Aab</sup>  | 6.8±0.4 <sup>BCDc</sup>   |                        |
|   | MAP                                       | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 7.7±1.0 <sup>Aab</sup>  | 8.3±0.8 <sup>Aa</sup>   | 7.6±0.9 <sup>Aab</sup>  | 7.3±1.2 <sup>Ab</sup>  | 7.3±1.0 <sup>Ab</sup>   | 7.0±0.9 <sup>BCDc</sup>   |                        |
| M3                                      | VAK                                       | 8.0±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 7.6±1.4 <sup>Aa</sup>   | 7.8±1.2 <sup>Aa</sup>   | 7.8±0.7 <sup>Aa</sup>   | 7.5±0.7 <sup>Aa</sup>  | 7.8±0.5 <sup>Aa</sup>   | 7.3±0.8 <sup>ABCDa</sup>  |                        |
|   | ATM                                       | 8.2±0.9 <sup>Aa</sup>                  | 7.8±1.1 <sup>Aa</sup>   | 8.3±0.6 <sup>Aa</sup>   | 7.6±0.8 <sup>Aa</sup>   | 7.6±0.8 <sup>Aa</sup>  | 7.8±0.6 <sup>Aa</sup>   | 6.7±1.1 <sup>Dc</sup>     |                        |
|   | MAP                                       | 8.3±1.0 <sup>Aa</sup>                  | 7.8±1.2 <sup>Aabc</sup> | 8.1±0.5 <sup>Aab</sup>  | 7.4±0.8 <sup>Abc</sup>  | 7.5±0.7 <sup>Abc</sup> | 7.6±0.8 <sup>Aabc</sup> | 7.1±0.9 <sup>ABCDCc</sup> |                        |
| VAK                                     | 8.0±1.0 <sup>Aa</sup>                     | 8.1±0.7 <sup>Aa</sup>                  | 8.0±0.4 <sup>Aa</sup>   | 7.6±1.1 <sup>Aa</sup>   | 7.8±0.9 <sup>Aa</sup>   | 8.2±0.8 <sup>Aa</sup>  | 7.8±0.8 <sup>Aa</sup>   |                           |                        |

M1: Koekstrude PA/PE M2: OPET/OPA/OPP M3: PP/PA/EVOH/PE ATM (hava atmosferi): %21 O<sub>2</sub> + %79 N<sub>2</sub>  
MAP: %50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub> VAK: Vakum

Aynı sütunda, verilen depolama gününde, aynı büyük harfe sahip uygulamalar arasında istatistiksel açıdan bir fark yoktur ( $P > 0.05$ ). Aynı satırda, verilen uygulamada aynı küçük harfe sahip depolama süreleri arasında istatistiksel açıdan fark yoktur ( $P > 0.05$ ). There is no statistical difference between applications with the same capital letter in the same column on a given storage day ( $P > 0.05$ ). There is no statistical difference between the storage times with the same lowercase letter in the same line ( $P > 0.05$ ).

## SONUÇ

Tüketime hazır dilimlenmiş Hatay peyniri ambalajsız muhafaza edildiğinde raf ömrü kuruma, ufalanma, sararma ve tadının bozulması nedenleriyle 5 gün olarak belirlenmiştir. Ambalajlı uygulamalarda ise ürünün tüm duyuşal nitelikleri (renk, koku, tekstür ve tat) 60 gün boyunca kabul edilebilir bulunmuştur. Özellikle en düşük gaz geçirgenliğine sahip malzemenin (PP/PA/EVOH/PE) vakum uygulaması dilimlenmiş Hatay peynirinin başlangıç kalitesini 60 gün boyunca korumada en başarılı uygulama olmuştur. Ancak vakumlu peynir dilimlerinde damlama kaybı problemi ortaya çıkmıştır. Bu olumsuz durum, ürünün duyuşal niteliklerinin tamamının korunduğu ve depolama sonunda lipid oksidasyonunda en düşük TBARS değerinin kaydedildiği aynı malzemenin yüksek CO<sub>2</sub> (%50 CO<sub>2</sub> + %50 N<sub>2</sub>) uygulamasıyla bertaraf edilebilir. Sonuç olarak, ambalajsız dilimlenmiş peynir örneklerinin raf ömrü su kaybına bağlı aşırı kuruma nedeniyle 5 gün, ambalajlı dilimlenmiş peynirlerde vakum ve oksijensiz MAP altında ise 60 gün olarak önerilmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

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

## YAZARLARIN KATKISI

Bengisu Toplu: Deneysel tasarım, formal analizler, taslak metnin yazımı. Hatice Sıçramaz: Taslak metnin yazımı ve revizyonu. Zehra Ayhan: Hipotezin kurulumu, deneysel tasarım, taslak ve metnin revizyonu. Yazarlar makalenin son halini okumuş ve onaylamıştır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje no: 9164). Çalışmaya katkılarından dolayı Güneş Süt Ürünleri İşletmesi'ne (Antakya, Hatay) ve ambalaj malzemelerinin temin edildiği Apack Ambalaj Makine Sanayi ve Tic. Ltd. Şti. (İstanbul) ve Süperfilm A.Ş.'ye (Gaziantep) teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

AOAC. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (17th ed.). Gaithersburg, MD, USA.

Atallah, A. A., El-Deeb, A. M., & Mohamed, E. N. (2021). Shelf-life of Domiate cheese under modified atmosphere packaging. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 8568–8581. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19956>

Ayhan, Z. (2022). Food Packaging. In R. E. Anlı & P. Şanlıbaba (Eds.), *Food: Science, Technology and Engineering* (1st ed., pp. 323–354). Nobel Akademik Yayıncılık.

Çayır, M. S., & Güzeler, N. (2020). İnek, keçi sütü ve bunların karışımlarından üretilen Hatay köy peynirlerinin bazı kalite özellikleri. *Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 39(9), 27–34.

Dermiki, M., Ntzimani, A., Badeka, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2008). Shelf-life extension and quality attributes of the whey cheese “Myzithra Kalathaki” using modified atmosphere packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 41(2), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.014>

Eliot, S. C., Vuilleumard, J. C., & Emond, J. P. (1998). Stability of shredded Mozzarella cheese under modified atmospheres. *Journal of Food Science*, 63(6), 1075–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15858.x>

Erkan, M. E., & Aksu, H. (2006). Modifiye atmosfer paketleme tekniğinin dilimlenmiş taze kaşar peynirinin mikrobiyolojik ve duyuşal özellikleri üzerine etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32(1), 57–68.

Favati, F., Galgano, F., & Pace, A. M. (2007). Shelf-life evaluation of portioned Provolone cheese packaged in protective atmosphere. *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.12.001>

Fedio, W. M., Macleod, A., & Ozimek, L. (1994). The effect of modified atmosphere packaging on the growth of microorganisms in cottage cheese. *Milchwissenschaft*, 49, 622–629.

Garabal, J. I., Rodríguez-Alonso, P., Franco, D., & Centeno, J. A. (2010). Chemical and biochemical study of industrially produced San Simón da Costa smoked semi-hard cow's milk cheeses: Effects of storage under vacuum and different modified atmospheres. *Journal of Dairy*



- Science*, 93(5), 1868–1881. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2749>
- Gonzalez-Fandos, E., Sanz, S., & Olarte, C. (2000). Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Cameros cheese packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 17(4), 407–414. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0338>
- Gunasekaran, S., & Ak, M. M. (2002). *Cheese Rheology and Texture* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420031942>
- Hotchkiss, J. H., Werner, B. G., & Lee, E. Y. C. (2006). Addition of Carbon Dioxide to Dairy Products to Improve Quality: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 158–168. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00008.x>
- Jafarzadeh, S., Salehabadi, A., Mohammadi Nafchi, A., Oladzadabbasabadi, N., & Jafari, S. M. (2021). Cheese packaging by edible coatings and biodegradable nanocomposites; improvement in shelf life, physicochemical and sensory properties. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 218–231. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.021>
- Judd, D. B., & Wyszecski, G. (1975). *Color in business, science, and industry* (3rd ed.). Wiley-Interscience.
- Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., & Petersen, M. A. (2003). Light-induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 13(2–3), 239–249. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00156-5)
- King, R. L. (1962). Oxidation of Milk Fat Globule Membrane Material. I. Thiobarbituric Acid Reaction as a Measure of Oxidized Flavor in Milk and Model Systems. *Journal of Dairy Science*, 45, 1165–1171.
- Kristensen, D., Orlie, V., Mortensen, G., Brockhoff, P., & Skibsted, L. H. (2000). Light-induced oxidation in sliced Havarti cheese packaged in modified atmosphere. *International Dairy Journal*, 10(1–2), 95–103. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00028-5)
- Lee, D. S., Yam, K. L., & Piergiovanni, L. (2008). *Food Packaging Science and Technology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781439894071>
- Li, W., Li, L., Zhang, H., Yuan, M., & Qin, Y. (2018). Evaluation of PLA nanocomposite films on physicochemical and microbiological properties of refrigerated cottage cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(1), e13362. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13362>
- Maniar, A. B., Marcy, J. E., Bishop, J. R., & Duncan, S. E. (1994). Modified Atmosphere Packaging to Maintain Direct-Set Cottage Cheese Quality. *Journal of Food Science*, 59(6), 1305–1308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb14701.x>
- Morris, B. (2016). *The Science and Technology of Flexible Packaging*. Elsevier Science. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00506-3>
- Papaioannou, G., Chouliara, I., Karatapanis, A. E., Kontominas, M. G., & Savvaidis, I. N. (2007). Shelf-life of a Greek whey cheese under modified atmosphere packaging. *International Dairy Journal*, 17(4), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.04.001>
- Pettersen, M. K., Eie, T., & Nilsson, A. (2005). Oxidative stability of cream cheese stored in thermoformed trays as affected by packaging material, drawing depth and light. *International Dairy Journal*, 15(4), 355–362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.006>
- Pikul, J., Leszczynski, D. E., & Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1309–1313. <https://doi.org/10.1021/jf00089a022>
- Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2000). The effect of modified atmosphere packaging on the microbial ecology in Requeijao, a Portuguese whey cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, 24(2), 107–124. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2000.tb00408.x>
- Piscopo, A., Zappia, A., de Bruno, A., & Poiana, M. (2015). Qualitative variations on Calabrian

- Provola cheeses stored under different packaging conditions. *Journal of Dairy Research*, 82(4), 499–505. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000539>
- Piscopo, A., Zappia, A., De Bruno, A., Pozzo, S., Limbo, S., Piergiovanni, L., & Poiana, M. (2019). Use of biodegradable materials as alternative packaging of typical Calabrian Provola cheese. *Food Packaging and Shelf Life*, 21, 100351. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100351>
- Rodriguez-Aguilera, R., Oliveira, J. C., Montanez, J. C., & Mahajan, P. V. (2011). Effect of modified atmosphere packaging on quality factors and shelf-life of mould surface-ripened cheese: Part II varying storage temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 337–342.
- Romani, S., Sacchetti, G., Pittia, P., Pinnavaia, G. G., & Dalla Rosa, M. (2002). Physical, chemical, textural and sensorial changes of portioned Parmigiano Reggiano cheese packed under different conditions. *Food Science and Technology International*, 8(4), 203–211. <https://doi.org/10.1106/108201302028118>
- Silva, S. F., Rocha, R. S., Esmerino, E. A., Pimentel, T. C., Gomes da Cruz, A., & Rodrigues Anjos, C. A. (2021). Impact of different modified atmosphere packaging on quality parameters and probiotic survival during storage of Minas Frescal cheese. *Food Bioscience*, 43, 101338. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101338>
- Trobetas, A., Badeka, A., & Kontominas, M. G. (2008). Light-induced changes in grated Graviera hard cheese packaged under modified atmospheres. *International Dairy Journal*, 18(12), 1133–1139. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.06.002>
- Wolf, I. V., Meinardi, C. A., & Zalazar, C. A. (2009). Production of Flavour Compounds from Fat During Cheese Ripening by Action of Lipases and Esterases. *Protein & Peptide Letters*, 16(10), 1235–1243. <https://doi.org/10.2174/092986609789071289>

**INVESTIGATION OF CHANGES IN SOME BIOACTIVE PROPERTIES OF  
PHENOLIC EXTRACTS FROM PULP AND SEED TISSUES OF *ZIZIPHUS  
JUJUBA* DURING IN VITRO DIGESTION**

**Eda Sensu<sup>1</sup>, Ayhan Duran<sup>2</sup>, Beraat Ozcelik<sup>3</sup> Aysun Yucetepe<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Food Technology, Istanbul Gelisim Higher Vocational School, Istanbul Gelisim University, Istanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Aksaray University, Aksaray, Türkiye

<sup>3</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Istanbul Technical University, Maslak, Istanbul, Türkiye

Received / Geliş: 15.03.2023; Accepted / Kabul: 24.04.2023; Published online / Online baskı: 10.05.2023

Şensu, E., Duran, A., Özçelik, B., Yücepe, A. (2023). Investigation of changes in some bioactive properties of phenolic extracts from pulp and seed tissues of *Ziziphus jujuba* during in vitro digestion. GIDA (2023) 48 (3) 602-613 doi: 10.15237/gida.GD23033

Şensu, E., Duran, A., Özçelik, B., Yücepe, A. (2023). Ziziphus jujube hünnap iç ve çekirdek dokularından fenoliklerin in vitro sindirim sırasında bazı biyoaktif özelliklerindeki değişimin araştırılması. GIDA (2023) 48 (3) 602-613 doi: 10.15237/gida. GD23033

**ABSTRACT**

In this study, changes in angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory,  $\alpha$ -amylase inhibitory and antioxidant activities, total phenolic content (TPC), total monomeric anthocyanin content (TMAC) of ultrasonic phenolic extracts from pulp and seed of *Ziziphus jujuba* were investigated during in vitro digestion. Bioaccessible fractions of phenolics in seed and pulp extracts were calculated as  $23.24 \pm 4.46\%$  and  $9.43 \pm 0.24\%$ , respectively. Moreover, bioaccessibility for TMAC in seed extracts ( $147.83 \pm 9.20\%$ ) was higher than pulp ( $15.76 \pm 3.89\%$ ) ( $P < 0.05$ ). A decrease in the antioxidant activity of the extracts occurred after in vitro digestion ( $P < 0.05$ ). The ACE inhibitory activity of undigested extracts from seed ( $86.04 \pm 0.00\%$ ) was higher than that of the undigested pulp extract ( $42.74 \pm 8.57\%$ ) ( $P < 0.05$ ). The  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of seed and pulp extracts was determined as  $49.18 \pm 0.35\%$  and  $36.07 \pm 5.83\%$ , respectively. The results of the study showed that ACE inhibitory activity and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the polyphenolics from pulp increased after in vitro digestion.

**Keywords:** *Ziziphus jujuba*, antioxidant activity, ACE inhibitory activity,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity, anthocyanin

***ZIZIPHUS JUJUBE* (HÜNNAP) İÇ VE ÇEKİRDEK DOKULARINDAN  
FENOLİKLERİN IN VITRO SİNDİRİM SIRASINDA BAZI BİYOAKTİF  
ÖZELLİKLERİNDEKİ DEĞİŞİMİN ARAŞTIRILMASI**

**ÖZ**

Bu çalışmada, *Ziziphus jujuba* iç ve çekirdeklerinden elde edilen ultrasonik fenolik ekstraktların in vitro sindirim sırasında anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ADE) inhibisyon,  $\alpha$ -amilaz inhibisyon ve

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: aysunyucetepe@aksaray.edu.tr

☎: (+90) 382 288 3502

Eda Şensu; ORCID no: 0000-0002-6240-8381

Ayhan Duran; ORCID no: 0000-0002-4042-0988

Beraat Ozcelik; ORCID no: 0000-0002-1810-8154

Aysun Yucetepe; ORCID no: 0000-0002-3800-4774

antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik madde (TFM) ve toplam monomerik antosiyanin miktarı (TMAM) üzerindeki değişiklikler incelenmiştir. In vitro sindirim sonrasında, çekirdek ve iç ekstraktlarındaki biyoerişilebilir fenolik fraksiyonlar sırasıyla  $23.24 \pm 4.46$  ve  $9.43 \pm 0.24$  olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, çekirdek ekstraktlarında toplam monomerik antosiyaninlerin biyoerişilebilirliği ( $147.83 \pm 9.20\%$ ) iç ekstraktların toplam monomerik antosiyaninlerinin biyoerişilebilirliğinden ( $15.76 \pm 3.89\%$ ) daha yüksek bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). In vitro sindirim sonrasında ekstraktların antioksidan aktivitesinde azalma meydana gelmiştir ( $P < 0.05$ ). Çekirdek ekstraktlarının sindirim öncesi ADE inhibisyon aktivitesi ( $86.04 \pm 0.00$ ), sindirim öncesi iç ekstraktın ADE inhibisyon aktivitesinden ( $42.74 \pm 8.57$ ) daha yüksektir ( $P < 0.05$ ). Çekirdek ve iç ekstraktların  $\alpha$ -amilaz inhibisyon aktivitesi sırasıyla  $49.18 \pm 0.35$  ve  $36.07 \pm 5.83$  olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre iç fraksiyonundan elde edilen ekstraktların ADE inhibisyon ve  $\alpha$ -amilaz inhibisyon aktivitesi in vitro sindirimden sonra artmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Ziziphus jujuba*, antioksidan aktivite, ADE inhibisyon aktivite,  $\alpha$ -amilaz inhibisyon aktivite, antosiyanin

## INTRODUCTION

*Ziziphus jujuba*, also known as jujube, is an orangish-burgundy, brown fruit with aromatic flavor which grows mainly in warm and subtropical regions such as Southeast Asia, China and the Mediterranean (Hoshyar et al., 2015). Jujube, which has approximately 900 species, is grown intensively in the western and southern parts of Anatolia in Türkiye (Imamoglu, 2016; Naik et al., 2013). It has been used in the treatment of intestinal diseases and anxiety in traditional medicine for a long time (Imamoglu, 2016; Choi et al., 2012). The recent studies have also shown that jujube has various bioactive properties such as antioxidant (Wang et al., 2012; Wu et al., 2012; Zhang et al., 2010), antiallergic (Naik et al., 2013), antimicrobial (Hamedi et al., 2015), anti-inflammatory (Goyal et al., 2011; Kumar et al., 2004), immunostimulant (Ganachari et al., 2004), antidiabetic (Hemmati et al., 2015b; Shirdel et al., 2009), antiobesity (Hemmati et al., 2015a), sedative, hypnotic (Jiang et al., 2007) and hypoglycemic activities (Shirdel et al., 2009). Anthocyanins are pigments attached to the flavonoid group found in many plants and fruits. They are natural colorants with antioxidant properties that are easily soluble in water and give color in a wide area between orange, red, purple, and blue (Shi et al., 2018; Castañeda-Ovando et al., 2009).

There is a widespread understanding that plants with greater polyphenolics have better antioxidant effects (Chel-Guerrero et al., 2018). Antioxidants are various natural metabolites synthesized by

plants against free radicals to protect themselves (Angerhofer et al., 2009). Free radicals cause many degenerative diseases such as diabetes, cardiovascular diseases, and cancer (Sarmadi and İsmail, 2010). The jujube is a good source of polyphenolics and anthocyanins which responsible antioxidant activity (Li et al., 2005; Koley et al., 2016; Liu et al., 2020).

Hypertension is an important risk factor for cardiovascular diseases. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) plays a key role in regulating blood pressure and inhibition of this enzyme is required to treat hypertension. The ACE inhibitors are widely used to control hypertension. Synthetic drugs used for this purpose have some side effects such as dry cough and skin rash (Daskaya-Dikmen et al., 2017). Therefore, researchers have investigated the effect of natural sources like plant extracts on hypertension in recent years (Şensu et al., 2021; Rawat et al., 2016). For instance, Kumar et al. (2011) reported that vanillic acid, a phenolic compound, exhibited antihypertensive effect in hypertensive mice.

Diabetes, which is one of degenerative diseases, causes various damages including retinopathy, nephropathy, and neuropathy on the related organs due to the inability to regulate the sugar rate (glycemia) in the blood (Al-Azzawie and Alhamdani, 2006). According to a report in 2019, approximately 463 million people in the world are known to have diabetes and it is estimated that this number will reach 700 million by 2045 (Senevirathne et al., 2021). Adefegha et al. (2015)

showed that phenolic extracts obtained from *Annona muricata* have antidiabetic and antihypertensive effects. It has been also reported that the jujube fruit extracts exhibited antidiabetic effect exerting inhibitory activity against  $\alpha$ -amylase by Mourya et al., 2017; Hemmati et al., 2015a; Marmouzi et al., 2019.

There are a lot of studies about antioxidant, antihypertensive and antidiabetic activities of whole jujube fruit in the literature. However, to our knowledge, there is no study on the changes in angiotensin-I converting enzyme inhibitory,  $\alpha$ -amylase inhibitory and antioxidant activities and total phenolic content and total monomeric anthocyanin content of seed and pulp fractions from jujube without peel tissue during in vitro digestion. Therefore, in the present study, changes in these bioactive properties were investigated during in vitro digestion. Moreover, seed and pulp fractions were compared in terms

of angiotensin-I converting enzyme inhibitory,  $\alpha$ -amylase inhibitory and antioxidant activities and total phenolic content and total monomeric anthocyanin content. Thus, it was aimed to reveal the bioactive potential of seed and pulp fractions from jujube grown in Türkiye.

## MATERIALS AND METHOD

### Materials

The jujube fruit was collected from an orchard, which is located at coordinates of 38°15'56" N and 34°04'00" E, in Aksaray province in Türkiye. The surface contaminants of the fruits were removed by washing under tap water, pulp and seed fractions were carefully separated by hand using a knife. Then, they were freeze-dried and the lyophilized samples were stored without exposure to light and oxygen at -20 °C until the extraction process. The visual appearance of the lyophilized pulp and seed fractions was given in Figure 1.



Figure 1. Visual observation of lyophilized pulp and seed fractions from *Ziziphus jujube*.

Folin-Ciocalteu's reagent and gallic acid were purchased from (Merck, Darmstadt, Germany). Sodium carbonate, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), copper (II) chloride, Trolox, neocuprin, potassium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, dimethyl sulfoxide (DMSO), sodium phosphate, starch, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), sodium chloride, sodium hydroxide, ethyl acetate,  $\alpha$ -amylase, hippuryl-his-leu (HHL), angiotensin-converting enzyme (ACE), methanol, pepsin, bile salts and pancreatin were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, Missouri, USA). All of the solvents and chemicals utilized were of the analytical grade.

### Method

#### Ultrasound-assisted extraction

Ultrasound-assisted extraction of polyphenolics from seed and pulp fractions of jujube without peel fraction was carried out using the method of Erşan et al. (2017) with slight modification. Accordingly, 0.5 g lyophilized sample was mixed with 5 mL of extraction solvent (methanol: Milli-Q water:formic acid (80:19:1, v/v/v)). The ultrasound procedure was applied to the mixture for 20 seconds at 65% power using an ultrasound device (Sonopuls HD 2200 ultrasonic homogeniser, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) with a titanium type probe (Bandelin Titanium Long Tip Probe VS 70 T, 13

mm diameter). Ultrasonication application was performed by immersing the probe to a depth of 2.5 mL into a 50 mL beaker including the sample. During the ultrasonication application, in order to prevent heating of the sample, the beaker containing the sample was placed in a beaker with a water-ice mixture, and temperature of the samples was kept between 20-25 °C. After ultrasonication, the samples were centrifuged at 6000 rpm for 5 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was extracted two more times using the same amount of extraction solvent. The extracts were combined and evaporated by using a rotary evaporator (IKA RV10, Germany) at 40 °C. Then, the extracts were stored at -20 °C further analysis.

#### Total phenolic content (TPC)

The TPC of the samples was performed according to the Folin-Ciocalteu method (Toor and Savage, 2006). Briefly, 200 µL sample was mixed with 1.5 mL of 10-fold diluted Folin-Ciocalteu's reagent and 1.2 mL of sodium carbonate solution. The mixture was left to stand in the dark for 90 min. The absorbance was read at 765 nm by using a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). The results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/g sample in dry weight (dw).

#### Total monomeric anthocyanin content (TMAC)

Analysis of total monomeric anthocyanin was carried out according to the pH differential method (AOAC method 2005.02). Briefly, the samples were diluted with 0.025 M KCl (pH 1.0) and 0.4 M CH<sub>3</sub>COONa (pH 4.5) and the absorbance was measured at 530 nm and 700 nm. TMAC was determined by following formula:

$$\text{TMAC (cyanidin-3-O-glucoside equivalent, } \mu\text{g/g dw)} = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 10^3}{\epsilon \times L} \quad (1)$$

Where A = (A<sub>520</sub> - A<sub>700</sub>)<sub>pH 1.0</sub> - (A<sub>520</sub> - A<sub>700</sub>)<sub>pH 4.5</sub>, MW is the molecular weight of cyanidin-3-O-glucoside (449.2 g/mole), DF is the dilution factor, ε is the molar extinction coefficient of cyanidin-3-O-glucoside (26,900 L/cm.mole) and L is the path length (0.75 cm).

#### Determination of antioxidant activity (AOA) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical scavenging (DPPH) method

The antioxidant activity of the samples was determined by DPPH method (Kumaran and Karunakaran, 2006). Briefly, 100 µL sample was diluted with 2 mL of 0.1 mM DPPH (in methanol). After shaking for 10 seconds, the sample was kept at room temperature in the dark for 30 min and absorbance was measured at 517 nm. The results are expressed in mg Trolox equivalent (TE)/g sample dw.

#### The cupric ion reduction antioxidant capacity determination (CUPRAC)

The antioxidant activity of the samples was determined by CUPRAC method (Apak et al., 2004). Accordingly, 100 µL sample was mixed with 1 mL of 10<sup>-2</sup> mM copper (II) chloride, neocuprine (in ethanol), ammonium acetate buffer (pH=7.0) solutions and Milli-Q water. After standing for 30 min at room temperature, absorbance was recorded at 450 nm and the results were expressed as mg TE/g sample dw.

#### The α-amylase inhibitory activity

The α-amylase inhibition analysis was performed according to the method by Yu et al. (2012) with slight modification. Accordingly, 30 µL sample (in 10% DMSO), 120 µL Milli-Q water, 300 µL of starch solution in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) and 150 µL α-amylase solution (1 U/mL) was pre-incubated at 25 °C for 10 min. Then, 300 µL of the DNS reagent (1% 3,5-dinitrosalicylic acid, 12% Na-K tartrate in 0.4 M NaOH) was added to terminate the reaction. Enzymatic inhibition was carried out at 85 °C for 10 min. After adding 675 µL deionized water, the mixture was cooled down to room temperature. The α-amylase activity was measured at 540 nm and calculated by the following formula:

$$\alpha - \text{amylase inhibitory activity} = \frac{(A-B)}{A} \times 100 \quad (2)$$

Where A represents the absorbance in the presence of buffer solution and B represents

absorbance in the presence of the  $\alpha$ -amylase and sample solution.

### Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity

The ACE inhibitory analysis was performed by the method of Ahn et al. (2012). Briefly, 50  $\mu$ L ACE solution (25 mU/mL) was added to 50  $\mu$ L of diluted sample which was dissolved in borate buffer and pre-incubated at 37 °C for 10 min. Then, 150  $\mu$ L of HHL substrate (5 mM, pH 8.3) was added to the mixture and incubated at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding 250  $\mu$ L of 1.0 M HCl. To extract hippuric acid, 0.5 mL of ethyl acetate was added and the test tubes were centrifuged at 3200 rpm for 15 min. After centrifugation, 0.2 mL of the supernatant was evaporated at room temperature for 12 h. The hippuric acid was dissolved in deionized water and the ACE inhibition activity was measured at 228 nm calculated by the following formula:

$$\text{ACE inhibition activity (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (3)$$

Where  $A_{\text{blank}}$  represents absorbance in the presence of Milli-Q water,  $A_{\text{control}}$  represents absorbance in the presence of buffer solution and  $A_{\text{sample}}$  represents absorbance in the presence of the ACE and sample solution.

### In vitro gastro-intestinal digestion and bioaccessibility

Bioaccessibility analysis by in vitro gastro-intestinal digestion was performed according to the INFOGEST method developed by Minekus et al. (2014) with some modifications. Briefly, 15 mL of salivary solution and 1 g of samples were mixed and the mixture was pre-incubated at 37 °C and 100 rpm for 15 min. After 15 min, 20 mL of stomach solution was added to this mixture and incubated again at 37 °C and 100 rpm for 1 h. Then, 10 mL of the mixture was collected as post-gastric (PG) digestion. Then, 5 mL of 120 mM NaCl, 5 mL of 120 mM KCl and 4.5 mL of intestinal solution were added to the remained mixture and reincubated again at 37 °C and 100 rpm for 2 h. At the end of the time, the mixture was collected as post-intestinal (PI) digestion. The PG and PI samples were centrifuged 10,000 rpm

for 15 min and the supernatants were stored at -20 °C until further analysis. Bioaccessibility (%) of the samples was calculated by the following formula:

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = \frac{\text{Bioactive content of digested samples}}{\text{Bioactive content of undigested samples}} \times 100 \quad (4)$$

### Statistical analysis

Experimental data were given as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was carried out using a IBM SPSS software (version 22.0, SPSS, Chicago, IL, USA). The differences were compared using Tukey test and  $p \leq 0.05$  was considered to be significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Change in TPC during in vitro digestion

According to the results, the differences between TPCs of the undigested seed and pulp extracts were determined as  $3.44 \pm 0.66$  mg GAE/g dw and  $10.72 \pm 0.48$  mg GAE/g dw, respectively ( $P < 0.05$ , Table 1). On the other hand, Wang et al. (2011) reported that TPCs of jujube pulp and seed extracts were 38.98 mg GAE/g dw and 30.95 mg GAE/g dw, respectively. Gao et al. (2012) determined that TPC of jujube between 27.56 mg GAE/g and 54.18 mg GAE/g fruit weight. These differences among the results can be associated with fruit variety, growing conditions, ripening level of the fruit, and the extraction conditions applied for the extraction of phenolics (Wang et al., 2011).

In the present study, TPC in the pulp extract was found to be higher than that of the seed ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the presence of phenolic compounds in different forms in jujube pulp and seed tissues may cause the differences in the phenolic levels in these tissues. For instance, the phenolic compounds in jujube seed tissues are mainly in insoluble-bound form whereas they are found in glycoside form in fruit pulp (Gao et al., 2013).

A decrease in TPCs of jujube seed and pulp fractions was observed after in vitro gastric and intestinal digestions ( $P < 0.05$ , Table 1). The bioaccessibility (%) of seed and pulp extracts after

in vitro gastric digestion was determined to be  $48.73 \pm 7.02\%$  and  $25.50 \pm 0.68\%$ , respectively ( $P < 0.05$ ). After in vitro intestinal digestion, the bioaccessibility (%) of seed and pulp extracts was calculated as  $23.24 \pm 4.46\%$  and  $9.43 \pm 0.24\%$ , respectively. Similarly, Ma et al. (2020) reported

that TPC of the soup obtained from bamboo leaves decreased approximately by 20% after in vitro digestion. According to Ma et al. (2020), this decrease may result from the loss in the stability of phenolic compounds under high pH values during intestinal digestion (Ma et al., 2020).

Table 1. Changes in total phenolic content, total monomeric anthocyanin content, antioxidant activity of jujube seed and pulp extracts during in vitro gastrointestinal digestion.

|  | Sample | Initial                | In vitro gastric digestion | In vitro intestinal digestion |
|--|--------|------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Total phenolics (mg/g)-TPC                                   | Seed   | $3.44 \pm 0.66^{b,x}$  | $1.63 \pm 0.08^{b,x}$      | $0.77 \pm 0.00^{b,x}$         |
|  | Pulp   | $10.72 \pm 0.48^{a,x}$ | $2.73 \pm 0.05^{a,y}$      | $1.01 \pm 0.02^{a,z}$         |
| Total anthocyanin content ( $\mu\text{g cyn-3-gly/g}$ )-TMAC | Seed   | $1.25 \pm 0.58^{a,y}$  | $8.39 \pm 0.00^{a,x}$      | $1.45 \pm 0.00^{a,y}$         |
|  | Pulp   | $2.23 \pm 0.55^{a,x}$  | $0.32 \pm 0.00^{b,y}$      | $0.33 \pm 0.00^{b,y}$         |
| DPPH (mg TE/g)   | Seed   | $4.04 \pm 0.18^{b,x}$  | $4.72 \pm 0.48^{a,x}$      | $0.58 \pm 0.46^{b,y}$         |
|  | Pulp   | $7.34 \pm 0.19^{a,x}$  | $4.80 \pm 0.21^{a,y}$      | $4.21 \pm 0.30^{a,y}$         |
| CUPRAC (mg TE/g)   | Seed   | $4.15 \pm 0.44^{b,x}$  | $5.93 \pm 2.43^{a,x}$      | $3.79 \pm 0.30^{a,x}$         |
|  | Pulp   | $9.38 \pm 0.51^{a,x}$  | $6.98 \pm 0.12^{a,y}$      | $2.99 \pm 0.44^{a,z}$         |

All the values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. The mean is an average of three samples ( $n = 3$ ) obtained from triplicated experiment. Different superscripts letters within the same line (x, y, z) and column (a, b) indicate significant difference ( $P < 0.05$ , Tukey).

### Change in TMAC during in vitro digestion

The TMAC of pulp extract ( $2.23 \pm 0.55 \mu\text{g cyn-3-gly/g dw}$ ) was higher than the TMACs of seed extract ( $1.25 \pm 0.58 \mu\text{g cyn-3-gly/g dw}$ ) before in vitro digestion ( $P < 0.05$ , Table 1). After gastric digestion, TMACs of the seed extract ( $8.39 \pm 0.00 \mu\text{g cyn-3-gly/g dw}$ ) were higher than that of pulp extract ( $0.32 \pm 0.00 \mu\text{g cyn-3-gly/g dw}$ ) ( $P < 0.05$ ). As seen in Table 1, the increase in TMAC of seed extract after in vitro gastric digestion was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Pérez-Vicente et al. (2002) stated that there was a significant increase in the concentration of anthocyanin compounds in pomegranate juice after in vitro gastric digestion. According to Koh et al. (2020), anthocyanin compounds are converted from the hemiketal form to the flavylium cation, which is more stable form, during gastric digestion where the pH was 2.0.

After intestinal digestion, TMACs of the seed and pulp extracts were determined as  $1.45 \pm 0.00 \mu\text{g}$

$\text{cyn-3-gly/g dw}$  and  $0.33 \pm 0.00 \mu\text{g cyn-3-gly/g dw}$ , respectively ( $P < 0.05$ ). Moreover, the bioaccessibility (%) value of TMAC in seed extract ( $147.83 \pm 9.20\%$ ) was higher compared to pulp extract ( $15.76 \pm 3.89\%$ ) after in vitro intestinal digestion. As seen in Table 1, there was a decrease in TMAC of pulp extracts after in vitro intestinal digestion ( $P < 0.05$ ). Likewise, de la Fuente et al. (2019) reported that anthocyanin compounds in broccoli and radish could not detect after in vitro digestion. In the study of Ma et al. (2020), anthocyanin compounds were degraded during in vitro digestion. Similarly, Koh et al. (2020) showed that there was a decrease in TMAC during in vitro intestinal digestion, due to the decreasing trend in all individual anthocyanin compounds. According to Pérez-Vicente et al. (2002), the decrease in TMAC is associated with conversion of flavylium cations to colorless chalcones during in vitro intestinal digestion. It has been stated that these "colorless anthocyanin pseudobases" are stable and in equilibrium with



the colored cationic forms in an acidic environment, however the anhydrobases gradually become more stable with the increase in pH after pH 5.0 (Pérez-Vicente et al. 2002).

#### Change in AOA during in vitro digestion

As shown in Table 1, the pulp extract exhibited higher AOA than that of the seed fraction because the pulp extract had the highest TPC than that of the seed extract ( $P < 0.05$ ). According to Chel-Guerrero et al. (2018), plants with higher level of polyphenolics also exhibit higher antioxidant activity. Zhang et al. (2010) found that jujube juice contained higher levels of ascorbic acid than other fractions. In the present study, the higher antioxidant activity of jujube pulp tissue may be associated with the higher concentration of ascorbic acid in jujube pulp. Also, it might be thought that the carbohydrates in the pulp fraction may have increased AOA. In the study of Li et al. (2011), polysaccharide extracts obtained from jujube fruit had antioxidant activity. Additionally, Wang et al. (2011) stated that the ripening level and variety of jujube and differences in its growing conditions may lead to discrepancy in TPC and AOA of jujube.

Antioxidant activity of the extracts decreased after in vitro digestion, in parallel with the decrease in both TPC and TMAC ( $P < 0.05$ , Table 1). The bioaccessibility for AOA was determined to be as  $24.65 \pm 1.76\%$  and  $91.58 \pm 2.48\%$  for seed extract and  $57.29 \pm 2.60\%$  and  $31.71 \pm 2.97\%$  for pulp extract by DPPH and CUPRAC methods, respectively. Similarly, Vinholes et al. (2018) and Goulas and Hadjisolomou (2019) showed that antioxidant activity of some fruits and vegetables decreased significantly after in vitro digestion. This decrease was associated with the fact that antioxidant compounds such as total phenolics and total anthocyanins are less reactive at the pH value of the intestinal environment, which is about 7.4 (Puangkam et al., 2017; de la Fuente et al., 2019).

#### Change in ACE inhibitory activity during in vitro digestion

The ACE inhibitory activity of the seed and pulp extracts was  $86.04 \pm 0.00\%$  and  $42.74 \pm 8.57\%$ , respectively ( $P < 0.05$ , Figure 2). Similarly, it was shown in other studies that polyphenolics can exhibit ACE inhibitory activity. For instance, Mohebbati et al. (2017) investigated the antihypertensive activity of jujube fruit in mice with high blood pressure and reported that hydroalcoholic extracts obtained from jujube fruit exhibited an antihypertensive effect in mice. Likewise, Nho et al. (2010) showed that ACE inhibitory activity of phenolic extracts from the leaves of *Boehmeria nivea* ranged from 14.47% to 80.31%. Also, López-Fernández-Sobrino et al. (2021) reported that wine sediments had antihypertensive potential in mice due to flavonols and anthocyanins in its composition.

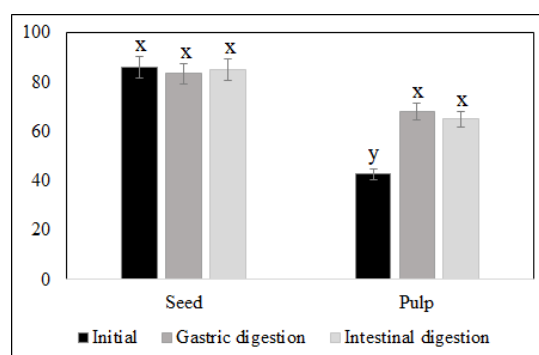


Figure 2. Changes in ACE inhibitory activity of jujube seed and pulp extracts during in vitro gastrointestinal digestion. Different letters (x, y) indicate significant difference ( $P < 0.05$ , Tukey).

The ACE inhibitory activity of bioaccessible fraction of the seed extract in the intestinal phase was  $99.04 \pm 4.95\%$ , while it was  $157.82 \pm 27.90\%$  for the pulp extracts. Similarly, Fernandez et al. (2013) reported that ACE inhibitory activity of grape extracts was  $>90\%$  before in vitro digestion and was  $>80\%$  after in vitro digestion. Likewise, Sensu et al. (2020) reported that red *Berberis* fruit had 73.84% ACE inhibitory activity before in vitro digestion and ACE inhibitory activity decreased to 65.51% after in vitro digestion.

### Change in $\alpha$ -amylase enzyme inhibition activity during in vitro digestion

The  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition activity of the undigested seed and pulp extracts were found to be  $49.18 \pm 0.35\%$  and  $36.07\% \pm 5.83\%$ , respectively ( $p \geq 0.05$ , Figure 3). The  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition activity after in vitro intestinal digestion of the pulp extract was statistically higher than that of the seed extract ( $P < 0.05$ ). Zhao et al. (2014) showed that polysaccharides extracted from jujube fruit had a significant *in vivo* antidiabetic activity by reducing the plasma glucose level. Similarly, Benammar et al. (2014) investigated the antidiabetic activities of extracts from leaves, roots and seeds of *Zizyphus lotus* in diabetic mice and reported that these extracts exhibited a reducing effect on the glucose level in mice. Furthermore, other studies in the literature have reported that natural polyphenols had an inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase activity (Quesada et al., 1996; McDougall et al., 2005; Ghosh et al., 2012; Liu et al., 2013; Zaidan et al., 2019).

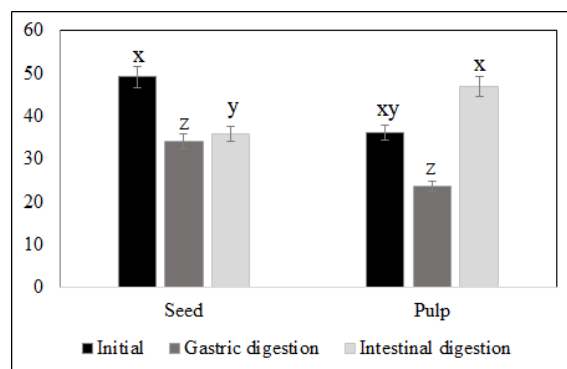


Figure 3. Changes in  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition activity of jujube seed and pulp extracts during in vitro gastrointestinal digestion. Different letters (x, y, z) indicate significant difference ( $P < 0.05$ , Tukey).

The bioaccessibility (%) value for  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition activity of the pulp extract increased after in vitro digestion ( $P < 0.05$ , Figure 3). Similarly, in the study of Ng and See (2019) it was showed that in vitro digestion caused a positive effect on the  $\alpha$ -amylase enzyme inhibition activity of plant extracts. According to Ng and See (2019), this increase in the carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory

activity of the digested extracts may be because of the release of aglycones phenolic from the glycosides throughout the digestion process.

### CONCLUSION

In the present study, the changes in angiotensin-I converting enzyme inhibitory,  $\alpha$ -amylase inhibitory and antioxidant activities, total phenolic content, total monomeric anthocyanin content of the extracts from the pulp and seed tissues of *Ziziphus jujuba* were investigated during in vitro gastro-intestinal digestion. It was found that, the pulp parts of the jujube fruit exhibited higher antioxidant activity compared to the seed since the total phenolic and anthocyanin contents in these plant tissues were higher than the seed part. Also, the results of the study showed that angiotensin-I converting enzyme and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities of the pulp extract increased after *in vitro* digestion. Consequently, it was concluded that jujube fruit can be used as a natural functional compound by food industry.

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded and supported by Aksaray University Scientific Research Projects Agency (BAP) (Project No: 2020-032 and Project No: 2018-045).

### REFERENCES

- Al-Azzawie, H. F., Alhamdani, M. S. S. (2006). Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, 78(12), 1371-1377.
- Adefegha, S. A., Oyeleye, S. I., Oboh, G. (2015). Distribution of phenolic contents, antidiabetic potentials, antihypertensive properties, and antioxidative effects of soursop (*Annona muricata* L.) fruit parts in vitro. *Biochemistry Research International*, 2015.
- Ahn, C. B., Jeon, Y. J., Kim, Y. T., Je, J. Y. (2012). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochemistry*, 47(12), 2240-2245.
- Angerhofer, C. K., Maes, D., Giacomoni, P. U. (2009). The use of natural compounds and botanicals in the development of anti-aging skin

- care products. In *Skin Aging Handbook* (pp. 205-263). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-8155-1584-5.50014-4>
- AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines pH Differential Method First Action 2005.
- AOAC international 2006. AOAC International Guidelines for Laboratories Performing Microbiological and Chemical Analyses of Food and Pharmaceuticals: An Aid to Interpretation of ISO/IEC 17025: 2005.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970-7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Benammar, C., Baghdad, C., Belarbi, M., Subramaniam, S., Hichami, A., Khan, N. A. (2014). Antidiabetic and antioxidant activities of *Zizyphus lotus* L aqueous extracts in Wistar rats. *Journal of Nutrition Food Sciences*, 8(004), 1-6.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Chel-Guerrero, L. D., Sauri-Duch, E., Fragoso-Serrano, M. C., Pérez-Flores, L. J., Gómez-Olivares, J. L., Salinas-Arreortua, N., ... Mendoza-Espinoza, J. A. (2018). Phytochemical profile, toxicity, and pharmacological potential of peels from four species of tropical fruits. *Journal of Medicinal Food*, 21(7), 734-743.
- Choi, S. H., Ahn, J. B., Kim, H. J., Im, N. K., Kozukue, N., Levin, C. E., Friedman, M. (2012). Changes in free amino acid, protein, and flavonoid content in jujube (*Zizyphus jujube*) fruit during eight stages of growth and antioxidative and cancer cell inhibitory effects by extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(41), 10245-10255. <https://doi.org/10.1021/jf302848u>
- Daskaya-Dikmen, C., Yucetepe, A., Karbancioglu-Guler, F., Daskaya, H., Ozcelik, B. (2017). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants. *Nutrients*, 9(4), 316. <https://doi.org/10.3390/nu9040316>
- de la Fuente, B., López-García, G., Mániz, V., Alegría, A., Barberá, R., Cilla, A. (2019). Evaluation of the bioaccessibility of antioxidant bioactive compounds and minerals of four genotypes of Brassicaceae microgreens. *Foods*, 8(7), 250. <https://doi.org/10.3390/foods8070250>
- Erşan, S., Üstündağ, Ö. G., Carle, R., Schweiggert, R. M. (2017). Determination of pistachio (*Pistacia vera* L.) hull (exo- and mesocarp) phenolics by HPLC-DAD-ESI/MSn and UHPLC-DAD-ELSD after ultrasound-assisted extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 103-114.
- Fernández, K., Labra, J. (2013). Simulated digestion of proanthocyanidins in grape skin and seed extracts and the effects of digestion on the angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chemistry*, 139(1-4), 196-202.
- Ganachari, M. S., Kumar, S., Bhat, K. G. (2004). Effect of *Zizyphus jujuba* leaves extract on phagocytosis by human neutrophils. *Journal of Natural Remedies*, 47-51.
- Gao, Q. H., Wu, C. S., Wang, M. (2013). The jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) fruit: a review of current knowledge of fruit composition and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(14), 3351-3363. <https://doi.org/10.1021/jf4007032>
- Gao, Q. H., Wu, C. S., Yu, J. G., Wang, M., Ma, Y. J., Li, C. L. (2012). Textural characteristic, antioxidant activity, sugar, organic acid, and phenolic profiles of 10 promising jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) selections. *Journal of Food Science*, 77(11), C1218-C1225. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02946.x>
- Ghosh, S., Ahire, M., Patil, S., Jabgunde, A., Bhat Dusane, M., Joshi, B. N., ... Chopade, B. A.

- (2012). Antidiabetic activity of *Gnidia glauca* and *Dioscorea bulbifera*: potent amylase and glucosidase inhibitors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/929051>
- Goyal, R., Sharma, P. L., Singh, M. (2011). Possible attenuation of nitric oxide expression in anti-inflammatory effect of *Ziziphus jujuba* in rat. *Journal of Natural Medicines*, 65, 514-518. <https://doi.org/10.1007/s11418-011-0531-0>
- Goulas, V., Hadjisolomou, A. (2019). Dynamic changes in targeted phenolic compounds and antioxidant potency of carob fruit (*Ceratonia siliqua* L.) products during in vitro digestion. *LWT*, 101, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.003>
- Hamedi, S., Arian, A. A., Farzaei, M. H. (2015). Gastroprotective effect of aqueous stem bark extract of *Ziziphus jujuba* L. against HCl/ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 35(6), 666-670.
- Hemmati, M., Asghari, S., Zohoori, E., Karamian, M. (2015a). Hypoglycemic effects of three Iranian edible plants; jujube, barberry and saffron: Correlation with serum adiponectin level. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(6), 2095-2099.
- Hemmati, M., Zohoori, E., Mehrpour, O., Karamian, M., Asghari, S., Zarban, A., Nasouti, R. (2015b). Anti-atherogenic potential of jujube, saffron and barberry: anti-diabetic and antioxidant actions. *EXCLI Journal*, 14, 908. <https://doi.org/10.17179/excli2015-232>
- Hoshyar, R., Mohaghegh, Z., Torabi, N., Abolghasemi, A. (2015). Antitumor activity of aqueous extract of *Ziziphus jujube* fruit in breast cancer: an in vitro and in vivo study. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4(2), 116-122. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(15\)30007-5](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(15)30007-5)
- Imamoglu, H. (2016). Total antioxidant capacity, phenolic compounds and sugar content of Turkey *Ziziphus jujubes*. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 15(5), 93-108.
- Jiang, J. G., Huang, X. J., Chen, J., Lin, Q. S. (2007). Comparison of the sedative and hypnotic effects of flavonoids, saponins, and polysaccharides extracted from Semen *Ziziphus jujube*. *Natural Product Research*, 21(4), 310-320. <https://doi.org/10.1080/14786410701192827>
- Koh, J., Xu, Z., Wicker, L. (2020). Blueberry pectin and increased anthocyanins stability under in vitro digestion. *Food Chemistry*, 302, 125343. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125343>
- Koley, T. K., Kaur, C., Nagal, S., Walia, S., Jaggi, S. (2016). Antioxidant activity and phenolic content in genotypes of Indian jujube (*Ziziphus mauritiana* Lamk.). *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1044-S1052.
- Kumar, S., Ganachari, M. S., Nagoor, V. S. (2004). Anti-inflammatory activity of *Ziziphus jujuba* Lam leaves extract in rats. *Journal of Natural Remedies*, 183-185.
- Kumar, S., Prahalathan, P., Raja, B. (2011). Antihypertensive and antioxidant potential of vanillic acid, a phenolic compound in L-NAME-induced hypertensive rats: a dose-dependence study. *Redox Report*, 16(5), 208-215. <https://doi.org/10.1179/1351000211Y.0000000009>
- Kumaran, A., Karunakaran, R. J. (2006). Antioxidant activity of polyphenols from *Phyllanthus debilis* Klein ex Willd. *Journal of Natural Remedies*, 141-146.
- Li, J. W., Ding, S. D., Ding, X. L. (2005). Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. *Process Biochemistry*, 40(11), 3607-3613.
- Li, J., Liu, Y., Fan, L., Ai, L., Shan, L. (2011). Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of *Ziziphus Jujuba* cv. Jinsixiaozao. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 390-394. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.051>
- Liu, Z., Dang, J., Wang, Q., Yu, M., Jiang, L., Mei, L., ... Tao, Y. (2013). Optimization of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* fruit using RSM and its anti-oxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.042>

- Liu, X. X., Liu, H. M., Yan, Y. Y., Fan, L. Y., Yang, J. N., Wang, X. D., Qin, G. Y. (2020). Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides extracted from jujube using subcritical water. *LWT*, 117, 108645. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108645>
- López-Fernández-Sobrinó, R., Soliz-Rueda, J. R., Margalef, M., Arola-Arnal, A., Suárez, M., Bravo, F. I., Muguerza, B. (2021). ACE Inhibitory and antihypertensive activities of wine lees and relationship among bioactivity and phenolic profile. *Nutrients*, 13(2), 679. <https://doi.org/10.3390/nu13020679>
- Ma, Y., Yang, Y., Gao, J., Feng, J., Shang, Y., Wei, Z. (2020). Phenolics and antioxidant activity of bamboo leaves soup as affected by in vitro digestion. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110941. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110941>
- Marmouzi, I., Kharbach, M., El Jemli, M., Bouyahya, A., Cherrah, Y., Bouklouze, A., ... Faouzi, M. E. A. (2019). Antidiabetic, dermatoprotective, antioxidant and chemical functionalities in *Zizyphus lotus* leaves and fruits. *Industrial Crops and Products*, 132, 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.007>
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. (2005). Anthocyanins from red wine—their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 66(21), 2540-2548. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.09.003>
- Minekus, M., Almingier, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T. O. R. S. T. E. N., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mohebbati, R., Rahimi, M., Bavarsad, K., Shafei, M. N. (2017). Long-term administration of *Zizyphus jujuba* extract attenuates cardiovascular responses in hypertensive rats induced by angiotensin II. *Ancient Science of Life*, 37(2), 68. [https://doi.org/10.4103/asl.ASL\\_122\\_17](https://doi.org/10.4103/asl.ASL_122_17)
- Mourya, P., Shukla, A., Rai, G., Lodhi, S. (2017). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of ethanolic and aqueous extracts from *Zizyphus oenoplia* (L.) Mill on alloxan-induced diabetic rats. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2016.12.002>
- Naik, S. R., Bhagat, S., Shah, P. D., Tare, A. A., Ingawale, D., Wadekar, R. R. (2013). Evaluation of anti-allergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Zizyphus jujuba* fruits in rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 811-818. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500014>
- Ng, Z. X., See, A. N. (2019). Effect of in vitro digestion on the total polyphenol and flavonoid, antioxidant activity and carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory potential of selected functional plant-based foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(4), e13903. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13903>
- Nho, J. W., Hwang, I. G., Kim, H. Y., Lee, Y. R., Woo, K. S., Hwang, B. Y., ... Jeong, H. S. (2010). Free radical scavenging, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, and in vitro anticancer activities of ramie (*Boehmeria nivea*) leaves extracts. *Food Science and Biotechnology*, 19, 383-390. <https://doi.org/10.1007/s10068-010-0054-6>
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., García-Viguera, C. (2002). In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2308-2312. <https://doi.org/10.1021/jf0113833>
- Puangkam, K., Muanghorm, W., Konsue, N. (2017). Stability of bioactive compounds and antioxidant activity of Thai cruciferous vegetables during in vitro digestion. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 5(2), 100-108. <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.5.2.06>
- Rawat, P., Singh, P. K., Kumar, V. (2016). Anti-hypertensive medicinal plants and their mode of action. *Journal of Herbal Medicine*, 6(3), 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.06.001>
- Quesada, C., Bartolomé, B., Nieto, O., Gómez-Cordovés, C., Hernández, T., Estrella, I. (1996). Phenolic inhibitors of  $\alpha$ -amylase and trypsin enzymes by extracts from pears, lentils, and

- cocoa. *Journal of Food Protection*, 59(2), 185-192. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.2.185>
- Sarmadi, B. H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Senevirathne, I. G. N. H., Abeysekera, W. K. S. M., Abeysekera, W. P. K. M., Jayanath, N. Y., Galbada Arachchige, S. P., Wijewardana, D. C. M. S. I. (2021). Antiamylase, antiglucosidase, and antiglycation properties of millets and sorghum from Sri Lanka. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5834915>
- Şensu, E., Kasapoğlu, K. N., Gültekin-Özgülven, M., Demircan, E., Arslaner, A., Özçelik, B. (2021). Orange, red and purple barberries: Effect of in vitro digestion on antioxidants and ACE inhibitors. *LWT*, 140, 110820. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110820>
- Shi, Q., Zhang, Z., Su, J., Zhou, J., Li, X. (2018). Comparative analysis of pigments, phenolics, and antioxidant activity of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) during fruit development. *Molecules*, 23(8), 1917. <https://doi.org/10.3390/molecules23081917>
- Shirdel, Z., Maadani, H., Mirbadalzadeh, R. (2009). Investigation into the hypoglycemic effect of hydroalcoholic extract of *Ziziphus Jujuba* Leaves on blood glucose and lipids in Alloxan-Induced diabetes in rats. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 8, 2.
- Toor, R. K., Savage, G. P. (2006). Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chemistry*, 99(4), 724-727. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.049>
- Vinholes, J., Reis, S. F., Lemos, G., Barbieri, R. L., de Freitas, V., Franzon, R. C., Vizzotto, M. (2018). Effect of in vitro digestion on the functional properties of *Psidium cattleianum* Sabine (araçá), *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick (butiá) and *Eugenia uniflora* L.(pitanga) fruit extracts. *Food Function*, 9(12), 6380-6390.
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Food Chemistry*, 135(3), 2078-2085. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.088>
- Wang, B. N., Liu, H. F., Zheng, J. B., Fan, M. T., Cao, W. (2011). Distribution of phenolic acids in different tissues of jujube and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1288-1292. <https://doi.org/10.1021/jf103982q>
- Wang, D., Zhao, Y., Jiao, Y., Yu, L., Yang, S., Yang, X. (2012). Antioxidative and hepatoprotective effects of the polysaccharides from *Zizyphus jujube* cv. Shaanbeitanzao. *Carbohydrate Polymers*, 88(4), 1453-1459. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.02.046>
- Wu, C. S., Gao, Q. H., Guo, X. D., Yu, J. G., Wang, M. (2012). Effect of ripening stage on physicochemical properties and antioxidant profiles of a promising table fruit 'pear-jujube' (*Zizyphus jujuba* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 148, 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.026>
- Zaidan, U. H., Zen, N. I. M., Amran, N. A., Shamsi, S., Abd Gani, S. S. (2019). Biochemical evaluation of phenolic compounds and steviol glycoside from *Stevia rebaudiana* extracts associated with in vitro antidiabetic potential. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101049. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101049>
- Zhang, H., Jiang, L., Ye, S., Ye, Y., Ren, F. (2010). Systematic evaluation of antioxidant capacities of the ethanolic extract of different tissues of jujube (*Zizyphus jujuba* Mill.) from China. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1461-1465. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.011>
- Zhao, Y., Yang, X., Ren, D., Wang, D., Xuan, Y. (2014). Preventive effects of jujube polysaccharides on fructose-induced insulin resistance and dyslipidemia in mice. *Food Function*, 5(8), 1771-1778. <https://doi.org/10.1039/C3FO60707K>



## INVESTIGATION OF THE POTENTIAL APPLICATIONS OF COLD PLASMA TECHNOLOGY IN FOOD SAFETY

**Janan Hossein Zadeh\*, Fikret Pazır**

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Ege University, Bornova, İzmir, Türkiye

Received /Geliş: 25.10.2022; Accepted / Kabul: 29.04.2023; Published online / Online baskı: 31.05.2023

Zadeh, J. H., Pazır, F. (2023). Investigation of the potential applications of cold plasma technology in food safety. *GIDA* (2023) 48 (3) 614-626 doi: 10.15237/ gida.GD22102

Zadeh, J. H., Pazır, F. (2023). Soğuk plazma teknolojisinin gıda güvenliği alanındaki potansiyel uygulamalarının araştırılması. *GIDA* (2023) 48 (3) 614-626 doi: 10.15237/ gida.GD22102

### ABSTRACT

Nowadays, the demand for the consumption of healthy foods is increasing day by day. Although fruits, vegetables, and foods made from them come first among these foods, meat and meat products are of great importance. However, there have been reports of food poisoning from such meals. Furthermore, problems are encountered in exports due to the microbial load of many such products. Different chemicals are used to reduce the microbial load of these products. However, due to the residue, these compounds are not utilized in many countries. Therefore, different methods are being investigated, and new technologies are being developed. Hydrostatic pressure, ultrasound, pulsed electric fields, irradiation, and pulsed light are some of these technologies. The purpose of this review is to investigate the possibilities of using the cold plasma system, which is one of these technologies, for the sterilization of foods. In simple terms, cold plasma is the fourth state of matter and is defined as a gaseous composition of ionic gas, polar ions, and gas atoms produced under atmospheric or low-pressure conditions. In addition to the many advantages of cold plasma, it has the possibility of being used for different purposes. Besides surface disinfection and detoxification, it is also used in the sterilization of packaged products, fresh fruits and vegetables, liquid foods, and meat and meat products.

**Keywords:** Cold plasma, non-thermal technology, food safety, sterilization, new technology

## SOĞUK PLAZMA TEKNOLOJİSİNİN GIDA GÜVENLİĞİ ALANINDAKİ POTANSİYEL UYGULAMALARININ ARAŞTIRILMASI

### ÖZ

Günümüzde sağlıklı gıdaların tüketimine yönelik talep giderek artmaktadır. Her ne kadar bu gıdaların başında meyve, sebzeler ve onlardan yapılan gıdalar gelse de et ve et ürünlerinin de önemi büyük olmaktadır. Ancak bu gıdalardan meydana gelen gıda zehirlenme vakaları bulunmaktadır. Ayrıca pek çok ürünün mikrobiyal yükü sebebinden dolayı ihracatta sorunlar ile karşılaşmaktadır. Bu ürünlerin mikrobiyal yükünün azaltılması için farklı kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak bu kimyasalların bıraktıkları kalıntı sebebi ile pek çok ülkede kullanılmamaktadır. Dolayısıyla farklı yöntemler araştırılıp yeni teknolojiler geliştirilmektedir. Bu teknolojilerden bazıları hidrostatik basınç, ultrases, vurgulu elektrik alan, ışınlama ve vurgulu ışık gibi yöntemlerdir. Bu derlemenin amacı ise bu teknolojilerden biri olan soğuk plazma sisteminin gıdaların sterilizasyonu amacı ile kullanım olanaklarının

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉ janan.hosseinzadeh@gmail.com

☎: (+90) 534 071 0016

☎: (+90) 232 311 4831

Janan Hossein Zadeh; ORCID no: 0000-0002-1024-9980

Fikret Pazır; ORCID no: 0000-0003-3997-4892



araştırılmasıdır. Basit bir ifadeyle, soğuk plazma maddenin dördüncü hali olup atmosferik veya düşük basınç koşulları altında üretilen iyonik gaz, polar iyonlar, gaz atomlarından oluşan gaz bileşimi olarak tanımlanabilmektedir. Soğuk plazmanın pek çok avantajı bulunmasının yanı sıra, farklı amaçlar için kullanım olanağı da bulunmaktadır. Yüzey dezenfeksiyonu ve detoksifikasyonun yanı sıra ambalajlı ürünlerin, taze meyve ve sebzelerin, sıvı gıdaların, et ve et ürünlerinin sterilizasyonunda da kullanılmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Soğuk plazma, ısı olmayan teknoloji, gıda güvenliği, sterilizasyon, yeni teknoloji

### INTRODUCTION

In the globalizing world, satisfying customer needs, responding to expectations, and food safety, which concerns human health, are the main topics that come up (Dalgıç, 2021). Thermal inactivation has traditionally been applied to protect food safety. However, thermal inactivation methods may have negative effects on components such as color, taste, and aroma. In recent years, foods to which non-thermal methods are applied have gained economic importance depending on the combination of factors such as ease of use, nutritional value, desired sensory properties, and environmental friendliness (Korkmaz and Gündüz, 2018, Dinçer and Topuz, 2018, Bhatt et al., 2018). For all these reasons, studies on cold plasma applications, which is a sustainable technology among non-thermal methods, have increased (Gündüz and Kışla 2014; Göçmen et al., 2017, Yüksel and Karagözlü, 2017). Cold plasma technology provides microbial inactivation, does not cause significant changes in the structure of food, and its applicability for safe food production is being investigated (Fernandez et al., 2013, Bozkurt, 2014, Şen, 2015, Fıratoglu, 2015, Daşan, 2016, Aktop, 2016, Devi et al., 2017, Kim and Min, 2018, Mehta et al., 2019). Cold plasma can be formed by many methods in terms of characteristics and applications. Some of these methods can be counted as dielectric barrier discharges (DBD), atmospheric pressure plasma jets, radio frequency and microwave plasmas (Scholtz et al., 2015, Keskin, 2017). The environmental friendliness of cold plasma technology increases its potential applications (Yüksel and Karagözlü, 2017). For the creation of plasma, environmental parameters such as pressure are important. However, depending on the plasma device, plasma may be generated in a variety of pressure conditions. It is still preferred in some applications due to the ease of forming

plasma in a low pressure environment. However, although plasma formation under atmospheric pressure can be performed under higher voltage, it is preferred because of the advantages it provides in terms of applicability to industry. This study was conducted to investigate the possibilities of using the cold plasma system, which is an alternative method to reduce the microbial load in foods, and to be a source for researchers.

### COLD PLASMA TECHNOLOGY

There are different methods for generating plasma. Some of the most commonly used ones for sterilization of foods can be categorized as dielectric barrier discharge (DBD), plasma jet (PJ), radio frequency (RF), and microwave (MW).

### DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE (DBD)

The DBD plasma consists of two metal electrodes, one or both of which are coated with a dielectric material such as polymer, glass, quartz, or ceramic (Fig.1). By applying high voltage, cold plasma is formed in this device, which has a changeable gap ranging from 0.1 mm to a few centimeters (Kogelschatz, 2003, Chizoba et al., 2017). Commonly used gases in DBD plasma are atmospheric air, nitrogen, argon and helium (Kim et al., 2018, Srangsomjit et al., 2022, Roy et al., 2023). Furthermore, this system is one of the most suitable forms of plasma production due to the dielectric material configuration and flexibility used (Ziuzina et al., 2013).

### PLASMA JET (PJ)

In this system, which has various configurations, the outer electrode is grounded, the central electrode is excited by RF, and the gas flowing at a high flow rate pushes the formed plasma out of the electrode region (Nishime et al., 2017) (Fig.1). This system, which is not suitable for application



to a wide area, produces a stable, homogeneous, and smooth discharge at atmospheric pressure (Nehra et al., 2008, Bermudez-Aguirre, 2020).

**RADIO FREQUENCY (RF)**

Radio frequency plasma is usually obtained by oscillating gas in an electromagnetic field (Fig.1). Radio frequency plasma operating at frequencies between Hz and MHz is produced by an induction coil or different electrodes kept outside the reactor (Ekezie et al., 2017).

Figure 1

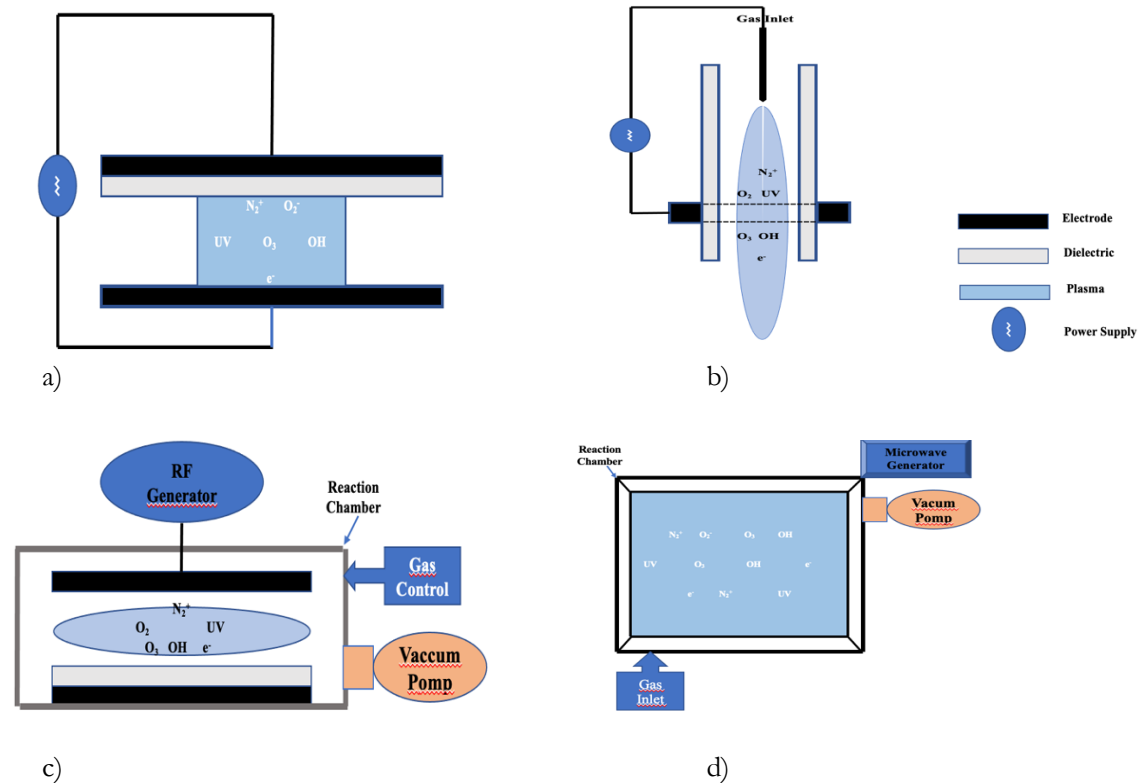


Fig.1. A type of DBD plasma configurations (a), A type of plasma jet configuration (b), A type of Radio Frequency plasma configuration(c), A type of microwave plasma configuration (d)

**PENETRATION POWER OF COLD PLASMA**

Gelatin gel and agarose gel are commonly employed to investigate the penetration of plasma-induced reactive oxygen species (ROS). It was stated that inactivation depths of up to 3.2 mm were reached with plasma application. It has been reported that the depth of plasma penetration varies depending on both the plasma

**MICROWAVE (MW)**

Microwave discharges are produced by electromagnetic waves released by a magnetron in microwave plasma generators (Fig. 1). Thus, cold plasma is created in the microwave electric field without electrodes. In this system, where plasma is produced at low and atmospheric pressure, gas requirements are low and generally large quantities of reactive species are released (Thomas and Mittal, 2013, Ekezie et al., 2017).

application time and the type of microorganism (Guo et al. 2020). Yadav et al. (2019) reported that 180 seconds of plasma applied to 2 mm thick slices of ham (1 cm<sup>2</sup>) significantly decreased the number of *Listeria innocua* (1.43 log CFU/cm<sup>2</sup>). In another study, there was a significant decrease in the total number of aerobic mesophilic bacteria with 60 kV-5 min of cold plasma applied to 1 cm-thick pitaya fruit slices (Li et al., 2019).

Roh et al. (2020), reported that chicken breast samples were boiled for 90 minutes, cut into cubes ( $1.5 \times 1.5 \times 1.5$  cm), covered with an edible coating (whey protein), and then plasma was applied to the samples for 39 kV-3.5 minutes. In chicken breast samples, the number of *E. coli* O157: H decreased by 3.90, *Salmonella* by 3.70, and *L. monocytogenes* by 3.50 logarithmic units as a result of the application. In a study, *Escherichia coli* inoculated lettuce was placed in different layers and exposed to cold plasma (Min et al., 2017). In their other study, they arranged two tomatoes inoculated with *Salmonella* in a two-layer and then applied cold plasma (Min et al., 2018). In these studies, it was stated that a significant logarithmic unit reduction was achieved in each microorganism due to the spaces between both lettuce and tomatoes. Thus, in future studies, a clearer result could be obtained by applying cold plasma to thicker foods.

### THE MECHANISM OF ACTION OF COLD PLASMA IN STERILIZATION

In the cold plasma environment, positive and negative ions, photons, electrons, free radicals, active or unactivated molecules and atoms, and their use in combination lead to microbial inactivation (Fig.2) (Moisan et al., 2002, Laroussi, 2005). These reaction species erode cell materials

such as the shell lipoprotein on the bacterial cell surface and the inner fat amylase of the cell membrane. Thus, the cell membrane ruptures and the contents flow out, which eventually leads to the death of the bacteria (Miao and Yun, 2011). Several researchers have claimed that UV radiation in the cold plasma ambient causes the splitting of DNA strands by inducing the development of thymine dimers (Laroussi, 2005, Gallagher et al., 2007, Wunderlich and Langowski, 2010, Fernandez and Thompson, 2012). However, other studies suggest that the power density of UV radiation emitted in the cold plasma ambient is very low and does not directly affect the sterilization process (Laroussi and Leipold, 2004, Boudam et al., 2006). It has also been reported that reactive oxygen species were more effective on the outer surface of microbial cells by causing significant oxidative stress conditions, which resulted in cell damage, enzyme deactivation, and DNA rupture (Misra et al., 2011, Pankaj and Keener, 2017). In another study, it was stated that the effect of plasma is largely dependent on the presence of water, with a stronger effect in moist organisms (minute amount of non-liquid water) than in dry organisms (complete drying of a drop with bacteria in a biological hood) (Thirumdas et al., 2015).

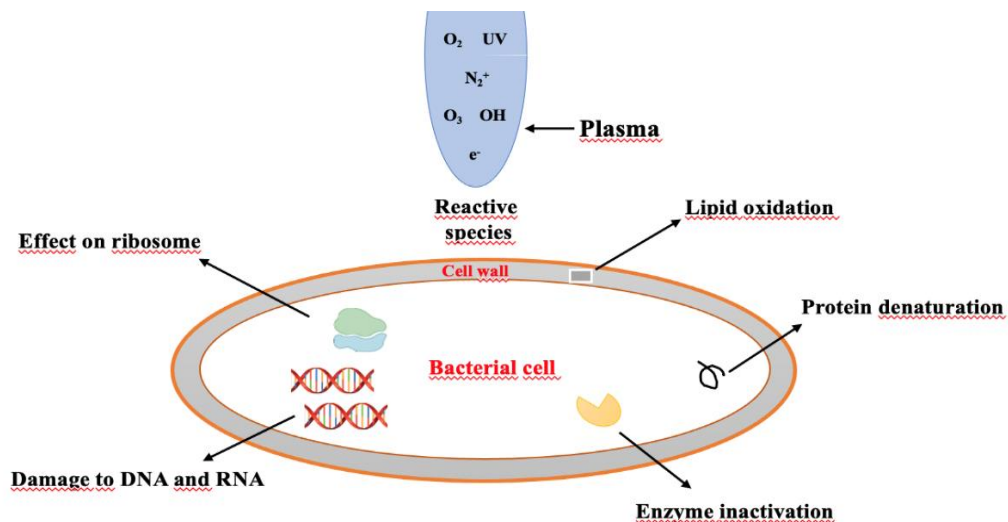


Fig.2. Mechanism of microbial inactivation by cold plasma treatment.

## THE USE OF COLD PLASMA TECHNOLOGY FOR THE STERILIZATION OF FOODS

Due to the limited depth of penetration of plasma technology, it is considered to be advantageous, especially for foods with a high surface/volume ratio. Hence, microbial decontamination is

provided on the product surfaces with the application of plasma, while the low penetration depth prevents the damage of important nutrients in the food (Surowsky et al., 2016). The effects of various cold plasma systems on different products have been investigated (Table 1).

Table 1. The effect of various plasma systems on different products

| Plasma type  | Food matrix and Microorganisms  | Observation                    | References              |
|--|---|--------------------------------|-------------------------|
| Atmospheric Pressure Fluidized Bed Plasma Jet      | Hazelnut And Corn (molds and yeasts in the natural flora)                     | 3.84 and 3.45 CFU/g            | (Mutlu., 2014)          |
| DBD Plazma   | Ground Almond Milk (molds and yeasts)   | Below the Determination Limit  | (Muhammad et al. 2019). |
| Atmospheric Pressure DBD                           | Tomato-Based Beverage (Mold and yeast)  | 1 log CFU/ml                   | (Metha et al., 2019)    |
| Low Pressure Plasma with Microwave Power           | Red Pepper Powder ( <i>Aspergillus flavus</i> )                               | 2.5 CFU/g                      | (Kim et al., 2014)      |
| Microwave-Assisted Cold Plasma                     | Onion Powder ( <i>Aspergillus brasiliensis</i> spores)                        | 1.6 log spores/cm <sup>2</sup> | (Kim et al., 2017),     |
| Radiofrequency Assisted Low Pressure DBD Plasma    | Peanuts ( <i>Aspergillus brasiliensis</i> )                                   | 3.5 log CFU/g                  | (Pignata et al., 2014)  |
| Atmospheric Pressure Plasma Jet                    | Hazelnut ( <i>Aspergillus parasiticus</i> and <i>Aspergillus flavus</i> spor) | 5.6 and 4.7 log CFU/g          | (Şen et al., 2019)      |
| DBD system with radio frequency power source       | Peanuts (Aflatoxin)   | %97.9 and %99.3                | (Devi et al., 2017)     |
| DBD Plasma   | Corn (Aflatoxin)  | %62 and %82                    | (Shi et al., 2017)      |
| DBD Plasma   | Hazelnut (Aflatoxin)  | %70                            | (Siciliano et al, 2016) |
| Microwave-Assisted Atmospheric Pressure Plasma Jet | On the petri dishes (Aflatoxin)   | Completely Removed Aflatoxins  | (Park et al., 2007)     |
| Cold Atmospheric Plasma (CAP)                      | Chicken breasts ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )                             | 100 % inactivation efficiency  | (Zhao et al., 2022 a)   |
| Atmospheric Cold Plasma                            | Apple Cider (Acid-adapted <i>E. coli</i> K12)                                 | 5 log CFU/mL                   | (Ozen et al., 2022)     |
| Cold Atmospheric Pressure Plasma                   | Tiger Nut Milk ( <i>Bacillus cereus</i> )                                     | 5.28 log CFU/mL                | (Muhammad et al., 2019) |
| Cold plasma jet                                    | On the petri dishes ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )                         | 100 % inactivation efficiency  | (Zhao et al., 2022 b)   |
| DBD Plasma   | Apple juice ( <i>Alicyclobacillus</i> contaminants)                           | 4.5 log CFU/mL                 | (Wang et al., 2023)     |

In the literature, there are atmospheric cold plasma applications created with different systems (DBD, plasma jet) (Surowsky et al., 2013, Pankaj et al., 2013, Bozkurt, 2014, Almeida et al., 2015, Kim et al., 2018, Filho et al., 2019, Li et al., 2019, Amanpour et al., 2019). In the studies, enzyme inactivation (Pankaj et al., 2013, Khani et al., 2017, Amanpour et al., 2019, Chutia et al., 2019) and microbial inactivation (Basaran et al., 2008, Mutlu, 2014, Şen, 2015, Fıratoglu, 2015, Gök et al., 2019) experiments were carried out on different products. For these purposes, cold plasma application has been researched for fresh fruits and vegetables such as tomatoes, spinach, kiwi, strawberries, mango, melon, and tangerines (Niemira and Sites, 2008, Perni et al., 2008, Misra et al., 2014, Ramazzina et al., 2015, Won et al., 2017, Jiang et al., 2017), fruit juices such as orange juice and cherry juice (Almeida et al., 2015, Garofulic et al., 2015), and dried products such as hazelnut, corn, wheat, paprika, black pepper, dried figs, and dried apples (Selçuk et al., 2008, Mutlu, 2014, Lee et al., 2015, Bubler et al., 2017, Choi et al., 2018). When the studies in the literature are examined, there are some studies that determine the effects of cold plasma application on mold and aflatoxin.

As a result of the studies conducted by Mutlu (2014), the use of atmospheric pressure fluidized bed plasma jet reduced the number of molds and yeasts in the natural flora of hazelnut and corn by 3.84 and 3.45 logarithmic units, respectively. As a result of the 12-minute DBD plasma applied to the ground almond milk, it was determined that the total number of molds and yeasts fell below the determination limit (Muhammad et al., 2019). Also, 1 log CFU/ml reduction was achieved in mold and yeast numbers by using the atmospheric pressure DBD system in a tomato-based beverage (Metha et al., 2019).

*Aspergillus flavus* number decreased by 2.5 log CFU/g in red pepper powder, in which low pressure plasma with microwave power source was applied (Kim et al., 2014). In other studies, in which microwave-assisted cold plasma was applied, 1.6 log spores/cm<sup>2</sup> reduction was achieved in the number of *Aspergillus brasiliensis*

spores inoculated into onion powder (Kim et al., 2017), while *Penicillium italicum* in orange peel was reduced by 84% (Won et al., 2017). As for the number of *Aspergillus brasiliensis* inoculated on peanuts, a 3.5 log CFU/g reduction was achieved with radio frequency assisted low pressure DBD plasma application (Pignata et al., 2014). As a result of the application of the atmospheric pressure plasma jet, a decrease of 5.6 and 4.7 logarithmic units was detected in the numbers of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* spores inoculated into the hazelnut sample, respectively (Şen et al., 2019).

In apple cider vinegar inoculated with acid-adapted *E. coli* K12, 5 log CFU/mL reduction was achieved as a result of atmospheric cold plasma application (Ozen et al., 2022). In another study, there was a decrease of 5.28 log CFU/ml in tiger nut milk inoculated with *Bacillus cereus* after atmospheric cold plasma application (Muhammad et al., 2019). Also, 4.5 log CFU/ml reduction was achieved as a result of DBD application to *Alicyclobacillus contaminans* inoculated into apple juice (Wang et al., 2023). In another study, the effect of cold plasma on the total bacterial count in sheep milk was compared with that of pasteurization (65 °C ± 2 °C for 30 min). According to this study, cold plasma application for 5 minutes resulted in 1.7 log reduction, while pasteurization resulted in 2.1 log reduction. There was no statistical difference between the two applications (Wang et al., 2022). In addition, after 3 minutes of high-voltage atmospheric cold plasma application, the amount of *Listeria monocytogenes* inoculated Queso Fresco cheese was significantly reduced (Ott et al., 2022). In a study examining the effect of cold plasma on chicken meat samples inoculated with *Staphylococcus aureus*, a 2-log reduction was achieved after 5 minutes of application (Abdel-Naeem et al., 2022). In another study, 100% inactivation was achieved after 5 minutes of cold plasma application to chicken breasts inoculated with *Pseudomonas aeruginosa* (Zhao et al., 2022 a).

With the DBD system, whose power source is radio frequency, 97.9%-99.3% reductions were achieved in the number of aflatoxins in peanuts,

in which cold plasma was applied. In the same study, the samples were kept at 30°C for 5 days after the plasma application, and a decrease of 65%–95% was achieved in the amount of aflatoxin B1 production depending on the strength and duration of the plasma application (Devi et al., 2017). While low-pressure cold plasma jet treatment provided a 2 log CFU/g reduction in 10 minutes for aflatoxins inoculated into hazelnut, peanut, and pistachio, it was said that 20 minutes of plasma treatment resulted in a 50% reduction in overall aflatoxin content (Basaran et al., 2008). Another study found that microwave-assisted atmospheric pressure plasma jet treatment for 5 seconds completely removed aflatoxins placed on the slide (Park et al., 2007). When DBD plasma was applied to aflatoxin-added corn sample for 1 and 10 minutes, the amount of aflatoxin was reduced by 62% and 82%, respectively (Shi et al., 2017). Another study found that applying DBD plasma to an aflatoxin-added hazelnut sample reduced it by 70% (Siciliano et al., 2016). In particular, the employment of such technologies in dry foods is of great importance. Because in the dried fruit and vegetable sector, besides thermal processes, non-thermal technologies such as chlorine-based disinfectants, ozonated water, and electrolyzed oxidizing water (EYS) are carried out, in order to reduce the microbial load (Öztekin et al., 2006, May and Fickak, 2007, Zorlugenç et al., 2008). The use of these non-thermal technologies has some disadvantages, such as the product's water intake and subsequent drying requirement. For these reasons, such technologies come to the fore.

## CONCLUSION

The demand for healthy nutrition, respect for nature, and therefore green technology is increasing in the world. Due to this awareness among most people, green technologies are gaining more importance. It is known by everyone that the chemicals used in the disinfection of fruits and vegetables leave a residue. Although laws impose restrictions on the use of these chemicals, it is known that they are still used today. However, the new technologies being developed can be an alternative to these chemicals. The cold plasma system is a green

technology that is utilized in food safety. Despite having a high initial cost, cold plasma has numerous advantages, such as providing strong sterilization at low temperatures, not affecting the structure of the packaging, working continuously at atmospheric pressure, and not containing chemicals.

Cold plasma is produced by different methods. However, the most commonly used methods in foods are jet plasma, DBD, and cold plasma produced by radiofrequency and microwave. Studies show that these methods can be used for surface disinfection, detoxification, liquid foods, meat, and meat products, as well as the disinfection of packages. When the studies are examined, it is seen that all of the cold plasma methods can be used with both liquid and solid foods. However, there is no clear information about which method is used for which foods. This shows that there are few studies on the penetration power of cold plasma. Although it is thought that the penetration power of the plasma jet is higher than other methods, there is no clear information. For the reasons mentioned above, it is necessary to investigate the possibilities of using this system in the industry.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Janan Hossein Zadeh: investigation, writing-review & editing

Fikret Pazır: investigation, editing & supervising

## REFERENCES

- Abdel-Naeem, H.H.S., Ebaid, E.M.S.M., Khalel, K.H.M., Imre, K., Morar, A., Herman, V., El-Nawawi, F.A.M. (2022). Decontamination of chicken meat using dielectric barrier discharge cold plasma technology: The effect on microbial quality, physicochemical properties, topographical structure, and sensory attributes. *LWT, Food Science and Technology*, 165,113-739. doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113739
- Aktop, S. (2016). Soğuk plazma tekniğinin et ürünlerindeki bazı patojenler üzerine etkisi.

- Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 29-51.
- Almeida, F.D.L., Cavalcante, R.S., Cullen, P. J., Frias, J.M., Paula Bourke, P., Fernandes, F. A.N., Rodrigues, S. (2015). Effects of atmospheric cold plasma and ozone on prebiotic orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 32,127–135. doi: 10.1016/j.ifset.2015.09.001 INNFOO 1357
- Amanpour, A., Vandamme, J., Polat, S., Kelebek, H., Durme, J.V., Sellia, S. (2019). Non-thermal plasma effects on the lipoxygenase enzyme activity, aroma and phenolic profiles of olive oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 54, 123-131. doi.org/10.1016/j.ifset.2019.04.004
- Basaran, P., Basaran-Akgul, N., Oksuz L. (2008). Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment. *Food Microbiology*, 25, 626-632. doi.org/10.1016/j.fm.2007.12.005
- Bermudez-aguirre, D. (2020). Advances in cold plasma applications for food safety and preservation. Elsevier, Richland, 351-362.
- Bhatt, H.K., Prasad, R.V., Joshi, D.C., Sagarika, N. (2018). Non-Thermal plasma system for decontamination of fruits, vegetables and spices: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 6(2), 619-627.
- Boudam, M. K., Moisan, M., Saoudi, B., Popovici, C., Gherardi, N., Massines, F. (2006). Bacterial spores inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39, 3494–3507. doi.org/10.1088/0022-3727/39/16/S07
- Bozkurt, D. (2014). Soğuk plazma uygulamasının vitaminler ve polifenol oksidaz (pfo) enzimi aktivitesi üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 56-73.
- Bubler, S., Ehlbeck, J., Schlüter, O.K. (2017). Pre-drying treatment of plant related tissues using plasma processed air: Impact on enzyme activity and quality attributes of cut apple and potato. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 40, 78-86. doi.org/10.1016/j.ifset.2016.05.007.
- Chizoba, E.F-G., Sun, D.-W., Cheng, J.-H. (2017). A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: current applications and future trends. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 46–58. doi: 10.1016/j.tifs.2017.08.007
- Choi, E.J., Yang, H.S., Park, H.W., Chun, H.H. (2018). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in red pepper powder using a combination of radio frequency thermal and indirect dielectric barrier discharge plasma non-thermal treatments. *LWT- Food Science and Technology*, 93,477-484. doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.081
- Chutia. H., Kalita, D., Mahanta, C.L., Ojah. N., Choudhury. A.J. (2019). Kinetics of inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in tender coconut water by dielectric barrier discharge plasma. *LWT-Food Science and Technology*, 101, 625-629. doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.071
- Daşan, B.G. (2016). Küf dekontaminasyonu için akışkan yatak atmosferik basınç plazma reaktörü tasarımı. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 55-94.
- Devi,Y., Thirumdas, R., Sarangapani, C., Deshmukh, R.R, Annature, U.S. (2017). Influence of cold plasma on fungal growth and aflatoxins production on groundnuts. *Food Control*, 77, 187-191. doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.019
- Dinçer, C, Topuz, A. (2018). Meyve suyu işlemede ultrases kullanımı. *The journal of food*, 43 (4), 569-581. doi.org/10.15237/gida.GD18037
- Ekezie, F.-G.C., Sun, D.-W., Cheng, J.-H. (2017). A review on recent advances in cold plasma technology for the food industry: current applications and future trends. *Trends Food Sci Technol*, 69, 46–58. doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.007
- Dalgıç, C. (2021). Gıda Güvenliği ve Kalite Yönetim Sistemleri. *Gıda Mikrobiyolojisi*, Erkmen, O. (baş ed.), Efil Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, Türkiye, s 600-603.

- Fernández, A., Noriega, E., Thompson, A. (2013). Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on fresh produce by cold atmospheric gas plasma technology. *Food Microbiology*, 33, 24-29. doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.007
- Fernandez, A., Thompson, A. (2012). The inactivation of *Salmonella* by cold atmospheric plasma treatment. *Food Research International*, 45(2), 678-684. doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.009
- Filho, E.G.A., Rodrigues, T.H.S., Fernandes, F.A.N., Brito, E.S.D., Cullen, P.J.F., Friase, J.M., Bourke, P., Cavalcante, R.S., Almeida, F.D.L., Rodrigues, S. (2019). An untargeted chemometric evaluation of plasma and ozone processing effect on volatile compounds in orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 53, 63-69. doi.org/10.1016/j.ifset.2017.10.001
- Fıratoglu, A. (2015). Soğuk plazmanın içme sularında *Escherichia coli* üzerine etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 25-40.
- Gallagher, M. J., Vaze, N., Gangoli, S., Vasilets, V.N., Gutsol, A.F., Milovanova, T., Anandan, S., Murasko, D.M., Fridman, A.A. (2007). Rapid inactivation of airborne bacteria using atmospheric pressure dielectric barrier grating discharge. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 35 (5), 1501-1510. doi.org/10.1109/TPS.2007.905209.Oct. 2007
- Garofulic, I.E., Jambrak, A.R., Milosevic, S., Dragovic-Uzelac, V., Zoric, Z., Herceg, Z. (2015). The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus var. Marasca*) juice. *LWT - Food Science and Technology Journal*, 62, 894-900. doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.036
- Göçmen, J.S., İştah, E.H., Çökeliler, D., Mutlu, M., Can, G.K., Alparslan, S., Çetin, C., Kartal, N., Özçelik, U.C., Aycan, Ç. (2017). Kan ve el kültüründen izole edilen koagülaz-negatif stafilocok izolatlarının biyofilm oluşumunun plazma polimerizasyon tekniği ile kaplanmış mikroplaklarda incelenmesi: deneysel model. *Flora*, 22 (4), 166-174. doi: 10.5578/flora.66226
- Gök, V., Aktop, S., Özkan, M., Tomard, O. (2019). The effects of atmospheric cold plasma on inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and some quality characteristics of pastırma A dry-cured beef product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 56, 102-188. doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102188
- Gündüz, G.T., Kışla, D. (2014). Applications of Non-Thermal Plasma Technology for Food Decontamination. 2nd International Congress on Food Technology, Kuşadası, Turkey, November 05-07. doi: 10.1111/jam.14823
- Guo, L., Zhang, J., Liu, D., He, T., Xu, R., Qi, Y., Zhang, H., Ron, M., Kong, M. G. (2020). Microbial inactivation in model tissues treated by surface discharge plasma. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 53(1), 015205. doi: 10.1088/1361-6463/ab4829
- Jiang, Y., Sokorai, K., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., Li, X., Mukhopadhyay, S., Jin, T Fan, X. (2017). Cold plasma- activated hydrogen peroxide aerosol inactivates *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria innocua* and maintains quality of grape tomato, spinach and cantaloupe. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 53-60. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.004
- Keskin, O. (2017). Argon Plazma Jet Üretimi. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 37-46.
- Khani, M.R., Shokri, B., Khajeh, K. (2017). Studying the performance of dielectric barrier discharge and gliding arc plasma reactors in tomato peroxidase inactivation. *Journal of Food Engineering*, 197, 107-112. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.11.012
- Kim, J. E., Lee, D. U., Min, S. C. (2014). Microbial decontamination of red pepper powder by cold plasma. *Food Microbiology*, 38, 128-136. doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.019
- Kim, J. E., Oh, Y. J., Won, M. Y., Lee, K. S., Min, S. C. (2017). Microbial decontamination of onion powder using microwave-powered cold plasma treatments. *Food Microbiology*, 62,112-123. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.006

- Kim, J.H.K, Min. S.C. (2018). Moisture vaporization-combined helium dielectric barrier discharge cold plasma treatment for microbial decontamination of onion flakes. *Food Control*, 84, 321-329. doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.018
- Kim, S.Y., Bang, I.H., Sea C., Min, S.C. (2018). Effects of packaging parameters on the inactivation of *Salmonella* contaminating mixed vegetables in plastic packages using atmospheric dielectric barrier discharge cold plasma treatment. *Journal of Food Engineering*, 242, 55-67. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.020
- Kogelschatz, U. (2003). Dielectric-barrier discharges: their history, discharge physics, and industrial applications. *Plasma Chem. Plasma Process.* 23, 1–46.
- Korkmaz, A., Gündüz, T.G. (2018). Meyve ve Sebzelerde UV-C Işık Uygulamaları ile Küf İnhibisyonu, *Akademik Gıda*, 16(4), 458-469.
- Laroussi, M. (2005). Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. *Plasma Processes and Polymers*, 2, 391–400. doi. Org/10.1002/ppap.200400078
- Laroussi, M., Leipold, F. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233, 81–86. doi.org/10.1016/j.ijms.2003.11.016
- Lee, H., Kim, J.E., Chung, M.S., Min, S.C. (2015). Cold plasma treatment for the microbiological safety of cabbage, lettuce, and dried figs. *Food Microbiology*, 51, 74-80. doi.org/10.1016/j.fm.2015.05.004
- Li, X., Li, M., Ji, N., Jin, P., Zhang, J., Zheng, Y., Zhang, X. and Li, F. (2019). Cold plasma treatment induces phenolic accumulation and enhances antioxidant activity in fresh-cut pitaya (*Hylocereus undatus*) fruit. *LWT—Food Science and Technology*. doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108447
- May, B. K., Fickak, A. (2003). The efficacy of chlorinated water treatments in minimizing yeast and mold growth in fresh and semi-dried tomatoes. *Drying Technology*, 21(6), 1127-1135. doi.org/10.1081/DRT-120021879
- Mehta, D., Nitya Sharma, N., Bansal, V., Sangwan, R.S., Yadav, S.K. (2019). Impact of ultrasonication, ultraviolet and atmospheric cold plasma processing on quality parameters of tomato-based beverage in comparison with thermal processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 52, 343-349. doi: 10.1016/j.ifset.2019.01.015
- Miao, H., Yun, G. (2011). The sterilization of *Escherichia coli* by dielectric-barrier discharge plasma at atmospheric pressure. *Applied Surface Science*, 257-7065–707. doi:10.1016/j.apsusc.2011.03.014
- Min, S.C., Roh, S.H., Niemira, B.A., Boyd, G., Sites, J.E., Uknalis, J., Fan, X. (2017). In-package inhibition of *E. Coli* O157:H7 on bulk Romaine lettuce using cold plasm. *Food Microbiology*, 65, 1-6. doi: 10.1016/j.fm.2017.01.010
- Min, S.C., Roh, S.H., Niemira, B.A., Boyd, G., Sites, J.E., Fan, X., Kimberly Sokorai, K., Jin, T.Z. (2018). In-package atmospheric cold plasma treatment of bulk grape tomatoes for microbiological safety and preservation. *Food Research International*, 108, 378-386. doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.033
- Misra, N. N., Tiwari, B. K., Raghavarao, K. S. M. S., Cullen, P. J. (2011). Nonthermal plasma inactivation of food-borne pathogens. *Food Engineering Reviews*, 159–170. doi.org/10.1007/s12393-011-9041-9
- Misra, N.N., Patil, S., Moiseev, T., Bourke, P., Mosnier, J.P., Keener, K.M., Cullen, P.J. (2014). Inpackage atmospheric pressure cold plasma treatment of strawberries. *J. Food Eng*, 125, 131–138. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.023
- Moisan, M., Barbeau, J., Crevier, M. C., Pelletier, J., Philip, N., Saoudi, B. (2002). Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 349–358. doi.org/10.1351/pac200274030349
- Muhammad, A. I., Li, Y., Liao, X., Liu, D., Ye, X., Chen, S., Hu, Y., Wang, J., Ding, T. (2019). Effect of dielectric barrier discharge plasma on



- background microflora and physicochemical properties of tiger nut milk. *Food Control*, 96, 119-127. doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.09.010
- Muhammad, A.I., Liao, R.L., Chen, W., Liu, D., Ye, X., Chen, S., Ding, T. (2019). Modeling the Inactivation of *Bacillus cereus* in Tiger Nut Milk Treated with Cold Atmospheric Pressure Plasma. *Journal of Food Protection*, 82 (11) 2019, 1828–1836. doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-586
- Muranyi, P., Wunderlich, J., Langowski, H. C. (2010). Modification of bacterial structures by a low-temperature gas plasma and influence on packaging material. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 1875–1885. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04815.x
- Mutlu, M. (2014). Gıda dekontaminasyonuna yönelik düşük sıcaklık-atmosferik basınç akışkan yatak plazma reaktörü tasarımı, Tubitak Projesi No: 113O779, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Nehra, V., Kumar, A., Dwivedi, H.K. (2008). Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. *International Journal of Engineering*, 2 (1) 53-68.
- Niemira, B.A., Sites, J. (2008). Cold plasma inactivates *Salmonella Stanley* and *Escherichia coli* O157: H7 inoculated on golden delicious apples. *J. Food Prot.*, 71, 1357–1365. doi: 10.4315/0362-028x-71.7.1357
- Nishime, T.M.C., Borges, A.C., Koga-Ito, C.Y., Machida, M., Hein, L.R.O., Kostov, K.G., (2017). Non-thermal atmospheric pressure plasma jet applied to inactivation of different microorganisms. *Surf. Coating. Technol.*, 312, 19–24. doi.org/ 10. 1016/ j. surfcoat. 2016.07.076
- Ott, L.C., Jochum, J., Burrough, L., Clark, S., Keener, K., Mellata, M. (2022). High voltage atmospheric cold plasma inactivation of *Listeria monocytogenes* in fresh Queso Fresco cheese. *Food Microbiology*, 105, 104-007. doi.org/10.1016/j.fm.2022.104007
- Ozen, E., Kumar, G.D., Mishra, A., Singh, R.K. (2022). Inactivation of *Escherichia coli* in apple cider using atmospheric cold plasma. *International Journal of Food Microbiology*, 382 (2022) 109913. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109913
- Öztekin, S., Zorlugenç, B., Zorlugenç, F. K. (2006). Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering*, 75(3), 396-399. doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.04.024
- Pankaj, S. K., Keener, K. M. (2017). Cold plasma: Background, applications and current trends. *Current Opinion in Food Science*, 16, 49-52. doi.org/10.1016/j.cofs.2017.07.008
- Pankaj, S.K., Misra, N.N., Cullen, P.J. (2013). Kinetics of tomato peroxidase inactivation by atmospheric pressure cold plasma based on dielectric barrier discharge. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 153- 157, doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.001
- Park, B. J. Takatori, K., Sugita-Konishi, Y., Kim, I.-H., Lee, M. H., Han, D. W., Chung, K. H., Hyun, S. O., Park, J. C. (2007). Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology*, 201, 5733-5737. doi.org/10.1016/j.surfcoat.2006.07.092
- Pignata, C., Angelo, D., Basso, D., Cavallero, M. C., Beneventi, S., Tartaro, D., Meineri, V., Gilli, G. (2014). Low-temperature, low-pressure gas plasma application on *Aspergillus brasiliensis*, *Escherichia coli* and pistachios. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (5), 1137-1148. doi.org/10.1111/jam.12448
- Ramazzina, I., Berardinelli, A., Rizzi, F., Tappi, S., Ragni, L., Sacchetti, G., Rocculi, P. (2015). Effect of cold plasma treatment on physico-chemical parameters and antioxidant activity of minimally processed kiwifruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 107, 55–65. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.04.008
- Roy, N.CH, Maira, N, Pattyn, C, Remy, A, Delplancke, M-P, Reniers, F. (2023). Mechanisms of reducing energy costs for nitrogen fixation using air-based atmospheric DBD plasmas over water in contact with the electrode. *Chemical Engineering Journal*, 461-141844. doi.org/10.1016/j.cej.2023.141844
- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., Julak, J. (2015). Nonthermal plasma a tool for decontamination and disinfection. *Biotechnol. Adv.*

- 33, 1108–1119. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.002
- Selçuk, M., Oksuz, L., Basaran, P. (2008). Decontamination of grains and legumes infected with *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by cold plasma treatment. *Bioresource Technology*, 99, 5104–5109. doi: 10.1016/j.biortech.2007.09.076
- Şen, Y. (2015). Atmosferik basınç plazma uygulamasının gıdaların dekontaminasyonu ve detoksifikasyonu amacıyla kullanımı. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 114-138.
- Şen, Y., Onal-Ulusoy, B., Mutlu, M. (2019). *Aspergillus* decontamination in hazelnuts: Evaluation of atmospheric and low-pressure plasma technology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 54, 235-242. doi.org/10.1016/j.ifset.2019.04.014
- Shi, H., Iileji, K., Stroshine, R. L., Keener, K., Jensen, J. L. (2017). Reduction of aflatoxin in corn by high voltage atmospheric cold plasma. *Food and Bioprocess Technology*, 10 (6), 1042-1052. doi: 10.1007/s11947-017-1873-8
- Siciliano, I., Spadaro, D., Prella, A., Vallauri, D., Cavallero, M.C., Garibaldi, A., Gullino, M.L. (2016). Use of Cold Atmospheric Plasma to Detoxify Hazelnuts from Aflatoxins. *Toxins*, 8-125. doi:10.3390/toxins8050125
- Srangsomjit, N., Bovornratanaraks, T., Chotineeranat, S., Anuntagool, J. (2022). Solid-state modification of tapioca starch using atmospheric nonthermal dielectric barrier discharge argon and helium plasma. *Food Research International*, 162-111-961. doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111961
- Surowsky, B., Bußler, S., Schlüter, O. K. (2016). Cold plasma interactions with food constituents in liquid and solid food matrices, In *Cold Plasma in Food and Agriculture*, Academic Press. doi: 10.1016/j.tifs.2016.07.001
- Surowsky, B., Fischer, A., Schlueter, O., Knorr, D. (2013). Cold plasma effects on enzyme activity in a model foodsystem. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 146-152. doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.002
- Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U. S. (2015). Cold plasma: A novel non- thermal technology for food processing. *Food Biophysics*, 10, 1–11. doi.org/ 10. 1007/s11483-014-9382-z
- Thomas, M., Mittal, K.L. (2013). *Atmospheric Pressure Plasma Treatment of Polymers: Relevance to Adhesion, Fundamental and Applied Aspect*, Wiley, Salem, 37-38.
- Wang, S., Liu, Y., Zhang, Y., Lü, X., Zhao, L., Song, Y., Zhang, L., Hao, J., Zhang, J., Ge, W. (2022). Processing sheep milk by cold plasma technology: Impacts on the microbial inactivation, physicochemical characteristics, and protein structure. *LWT, food science and technology*, 153,112-573. doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112573
- Wang, Z., Jia, H., Yang, J., Hu, Z., Wang, Z., Yue, T., Yuan, Y. (2023). Inactivation of *Alicyclobacillus* contaminans in apple juice by dielectric barrier discharge plasma. *Food Control*, 146-109475. doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109475
- Won, M.Y, Lee, S.J., Min, S.C. (2017). Mandarin preservation by microwave-powered cold plasma treatment Innovative. *Food Science and Emerging Technologies*, 39, 25-32. doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.021
- Yadav, B., Spinelli, A. C., Govindan, B. N., Tsui, Y. Y., McMullen, L. M., Roopesh, M. S. (2019). Cold plasma treatment of ready-to-eat ham: Influence of process conditions and storage on inactivation of *Listeria innocua*. *Food Research International*, 123, 276-285. doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.065
- Yüksel, Ç.Y and Karagözlü, N. (2017). Soğuk Atmosferik Plazma Teknolojisi ve Gıdalarda kullanımı, Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 14(2), 81-86. doi.org/10.25308/aduziraat.332684
- Zhao, Y., Shao, L., Jia, L., Meng, Z., Liu, Y., Wang, Y., Zou, B., Dai, R., Li, X., Jia, F. (2022a). Subcellular inactivation mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* treated by cold atmospheric plasma and application on chicken breasts. *Food Research International*, 160, 111-720. doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111720

Zhao, Y., Shao, L., Jia, L., Zou, B., Dai, R., Li, X., Jia F. (2022b). Inactivation effects, kinetics and mechanisms of air- and nitrogen-based cold atmospheric plasma on *Pseudomonas aeruginosa*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 79-103051. doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103051

Ziuzina, D., Patil, S., Cullen, P.J., Keener, K.M., Bourke, P., (2013). Atmospheric cold plasma inactivation of *Escherichia coli* in liquid media inside

a sealed package. *J. Appl. Microbiol.* 114, 778–787. doi.org/10.1111/jam.12087

Zorlugenç, B., Zorlugenç, F. K., Öztekin, S., Evliya, I. B. (2008). The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B1 in dried figs. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12), 3593-3597. doi.org/10.1016/j.fct.2008.09.003

## ULTRASONİKASYON VE SOKSALET YÖNTEMLERİYLE EKSTRAKTE EDİLEN KETENCİK TOHUM YAĞLARININ OKSİDATİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

**Ceren Mutlu, Fatma Korkmaz\***

Balikesir Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Balikesir, Türkiye

Geliş/Received: 25.01.2022; Kabul /Accepted: 25.05.2023; Online baskı /Published online: 03.06.2023

Mutlu, C., Korkmaz, F. (2023). Ultrasonikasyon ve soxhlet yöntemleriyle ekstrakte edilen ketencik tohum yağlarının oksidatif özelliklerinin belirlenmesi. GIDA (2023) 48 (3) 627-640 doi: 10.15237/gida.GD2030

Mutlu, C., Korkmaz, F. (2023). Determination of the oxidation properties of camelina seed oils extracted by ultrasonication and soxhlet methods. GIDA (2023) 48 (3) 627-640 doi: 10.15237/gida.GD23020

### ÖZ

Araştırmada ketencik tohumundan farklı sıcaklık (30, 45, 60°C), süre (15, 30, 45 dk) ve güç (%30, 65, 100) koşullarında ultrasonikasyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonunun optimizasyonu amaçlanmıştır. Optimum koşullarda elde edilen yağ, soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağ örneği ile verim, yağ asidi kompozisyonu ve oksidasyon özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Ultrasonikasyon yönteminde yağ verimi açısından optimum koşullar 38.16°C, 15 dk ve %30 ultrasonikasyon gücü ve bu koşullarda yağ verimi 24.44 g/100g olarak bulunmuştur. Oksidasyon analizleri sonuçlarına göre ise soxhlet ve ultrasonikasyon yöntemleri ile elde edilen yağların peroksit değerlerinin sırasıyla 3.39-69.25 ve 2.15-54.19 meqO<sub>2</sub>/kg yağ, konjuge dien değerlerinin ise sırasıyla 2.14-9.71 ve 1.79-7.22 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca uygulanan ekstraksiyon yöntemleri ketencik yağının yağ asidi kompozisyonunda önemli bir farklılığa neden olmamıştır. Ketencik yağının ekstraksiyonunda ultrasonikasyon tekniğinin bir alternatif olabileceği ve bu yağın fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılma potansiyelinin bulunduğu değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Camelina sativa*, optimizasyon, peroksit, linolenik asit

### DETERMINATION OF THE OXIDATION PROPERTIES OF CAMELINA SEED OILS EXTRACTED BY ULTRASONICATION AND SOXHLET METHODS

#### ABSTRACT

In the study, it was aimed to optimize oil extraction from camelina with ultrasonication at different temperature (30, 45, 60°C), time (15, 30, 45 min) and power (30, 65, 100%) conditions. The oil obtained under optimum conditions was compared with the oil by soxhlet extraction for yield, fatty acid composition and oxidation properties. The ultrasonication optimum conditions were 38.16°C, 15 min, and 30% ultrasonication power, and oil yield was 24.44 g/100g. The peroxide values of the oils obtained by soxhlet and ultrasonication methods were 3.39-69.25 and 2.15-54.19 meqO<sub>2</sub>/kg oil, respectively. The conjugated diene values of oils obtained by soxhlet and ultrasonication methods were 2.14-9.71 and 1.79-7.22, respectively. Moreover, the applied extraction methods did not cause a significant difference in the fatty acid composition of camelina oil. Ultrasonication technique can be an alternative for the *Camelina sativa* oil extraction and this oil has potential for using in the functional food production.

**Keywords:** *Camelina sativa*, optimization, peroxide, linolenic acid

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ *Corresponding author*

✉:fatma.korkmaz@balikesir.edu.tr

☎: (+90) 266 612 6313

Ceren Mutlu; ORCID no: 0000-0003-4943-2798

Fatma Korkmaz; ORCID no: 0000-0002-6834-4833

## GİRİŞ

Ketencik [*Camelina sativa* (L.) Crantz], Brassicaceae familyasının bir üyesi olup, kökeni Doğu Avrupa ve Orta Asya bölgelerine dayanan önemli bir yağ bitkisidir (Vollmann ve Eynck, 2015; Sydor vd., 2022). Ülkemizde “yalancı keten”, “Alman susamı” veya “Sibirya yağlı tohumu” gibi farklı isimlerle de bilinmektedir (Kurt ve Seyis, 2008). Ketencik farklı iklim koşullarına ve toprak yapısına uyum sağlamasıyla beraber su, gübre ve ilaç ihtiyacının da az olması sebebiyle diğer yağlı tohum bitkilerine göre önemli bir potansiyele sahiptir (Mondor ve Hernández-Álvarez, 2021). Ketencik, başta omega-3 olmak üzere esansiyel çoklu doymamış yağ asitleri, tokoferoller ve fitosteroller gibi önemli biyoaktif bileşikler içerdiği için son yıllarda ilgi çeken bitkisel kaynaklardan biri haline gelmiştir (Abramovič vd., 2007; Piravi-vanak vd., 2022).

Yetiştirildiği çevre koşullarına, çeşidine ve ekstraksiyon yöntemine göre ketencik tohumları %30-49 aralığında yağ içeriğine sahip olup, yağ asitlerinin %30-40'ı  $\alpha$ -linolenik asit, %15-25'i linoleik asit, %10-25'i oleik asit ve yaklaşık %3'ü ise erusik asitten oluşmaktadır (Abramovič vd., 2007; Berti vd., 2016; Mondor ve Hernández-Álvarez, 2021). Kendine özgü bileşimi sayesinde ketencik yağı enerji, kimya (kozmetik, deterjan gibi) ve gıda sanayinde hammadde olarak kullanılmaktadır (Leclère vd., 2021; Sydor vd., 2022). Özellikle elzem yağ asitlerinden olan  $\alpha$ -linolenik ve linoleik asitleri yüksek düzeyde içermesi nedeniyle ketencik, insan beslenmesi için değerli bir yağ kaynağı olarak görülmektedir (Popa, 2017; Mondor ve Hernández-Álvarez, 2021). Genel olarak ketencik yağı yüksek sıcaklıkta kızartmaya uygun olmasa da salata veya yemeklik yağ olarak tüketilmektedir (Berti vd., 2016). Ayrıca ketencik, fonksiyonel gıda ve besin takviyesi olarak da kullanılabilir (Sydor vd., 2022). Ketencik yağının fonksiyonel özellikleri yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden ve bu yağ asitlerinin de yarısından fazlasının omega-3 (%30-40) ve omega-6 (%15-20) yağ asitleri olmasından ileri gelmektedir (Terpinc vd., 2012; Sydor vd., 2022). Bununla birlikte ketencik yağında tekli doymamış yağ asitleri, bitki steroller, çeşitli fenolik bileşikler (rutin, kateşin ve

kuersetin) ve vitaminler (E, A ve B vitaminleri) olmak üzere çeşitli biyoaktif bileşenler de bulunmaktadır (Terpinc vd., 2012; Sydor vd., 2022).

Genel olarak ketencik tohumundan mekanik presleme, enzimatik ve solvent ekstraksiyon yöntemleri ile yağ ekstraksiyonu gerçekleştirilmektedir (Popa, 2017). Mekanik presleme yöntemi ile yüksek kalitede yağ elde edilebilse de ekstraksiyon verimi düşük ve enerji ihtiyacı yüksektir (Liu vd., 2009). Solvent ekstraksiyon yönteminde kullanılan hekzan, metanol, etanol ve petrol eteri gibi çözücülerin çevreye olası zararlı etkilerine ek olarak ekstraksiyon sıcaklığının yüksek ve süresinin uzun olması birtakım dezavantajlar oluşturmaktadır (Tian vd., 2013). Enzimatik ekstraksiyon yöntemi de çevre dostu ve uygulaması kolay bir yöntem olması sebebiyle yağ ekstraksiyonunda alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde hem ekstraksiyon uzun sürede gerçekleşmekte hem de düşük yağ verimi elde edilmektedir (Hu vd., 2020). Söz konusu bu yöntemlerin dezavantajları nedeniyle yağ ekstraksiyonunda alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (Tian vd., 2013). Bu doğrultuda son yıllarda özellikle ultrason destekli yağ ekstraksiyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Wang vd., 2020). Ultrason dalgalarının oluşturduğu akustik kaviteasyonlar sonucu açığa çıkan enerji ve basınç, bitkisel materyalin yüzeyinde yapısal değişimlerin meydana gelmesine neden olmaktadır. Böylece kullanılan çözücünün materyale transferi kolaylaşmakta ve ekstraksiyonun etkinliği artmaktadır. Sonuç olarak, bu yöntem ekstraksiyon süresinin ve solvent kullanımının azalmasını; enerji ve üretim verimliliğinin ise artmasını sağlamaktadır (Senrayan ve Venkatachalam, 2020; Wang vd., 2020; Oprescu vd., 2022). Ayrıca ultrasonikasyon uygulaması daha iyi kalitede yağ elde edilmesini de sağlamaktadır (Rajendran vd., 2021; Li vd., 2023).

Literatürde kanola (Jalili vd., 2018), ay çekirdeği (Moradi vd., 2018), kolza tohumu (Perrier vd., 2017), kabak çekirdeği (Hernández-Santos vd., 2016), nar çekirdeği (Goula vd., 2018; Rojo-Gutiérrez vd., 2021), fıstık (Haji Heidari ve

Taghian Dinani, 2018) ve kapok çekirdeği (Senrayan ve Venkatachalam, 2020) gibi farklı bitkisel materyallerden yağ ekstraksiyonu konusunda hem ultrasonikasyon gücü, çözücü-katı oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi gibi faktörlerin etkilerinin incelendiği hem de ultrasonikasyon destekli yağ ekstraksiyonun diğer yöntemlerle kıyaslandığı çalışmalar bulunmaktadır. Ancak yapılan literatür araştırmasında ketencik tohumlarından ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak yağ ekstraksiyonu konusunda bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bağlamda yapılan çalışmada, ketencik tohumundan ultrasonikasyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonu parametrelerinin (ekstraksiyon sıcaklık ve süresi ve ultrason gücü) optimizasyonun yapılması ve belirlenen optimum koşullarda ekstrakte edilen yağın oksidasyon özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Araştırmada materyal olarak kullanılan ketencik [*Camelina sativa* (L.) Crantz.] tohumları Denizli'de bulunan Tanoğlu Enerji ve Tarım Ürünleri firmasından temin edilmiştir. Yağ ekstraksiyon işlemlerinden hemen önce tohumlar bir öğütücü (Sinbo, SCM-2910, Çin) yardımıyla öğütülmüş ve 1 mm'lik elekten geçirilmiştir.

Araştırmada kullanılan kimyasallar ise Honeywell (Hessen, Almanya) ve Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya) firmalarından tedarik edilmiştir.

### Metotlar

#### Ketencik tohumundan yağ ekstraksiyonu

Araştırmada, ketencik tohumundan yağ ekstraksiyonunda ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon ve sokslet ekstraksiyon olmak üzere 2 farklı yöntem kullanılmıştır.

Ultrasonikasyon destekli yağ ekstraksiyonu Tontul vd. (2018)'in belirttiği yöntemle yapılmıştır. Ekstraksiyon 13 mm çapında prob kullanılarak ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonopuls HD 2200.2, Almanya) vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ekstraksiyon sırasında hekzan kaybının en düşük düzeyde olabilmesi amacıyla kapağında ultrason probunun

girebileceği kadar açıklık bulunan vida kapaklı cam bir kap (250 mL) kullanılmıştır. Örnek (15 g), üzerine hekzan (90 mL) ilave edildikten sonra sıcaklığı ayarlanmış su banyosu (Jeio Tech, Water Bath BW-20B, Kore) içerisine alınmış ve ardından içerisine ultrason probu daldırılarak farklı ultrasonikasyon gücü ve sürelerde ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Araştırmada uygulanacak ekstraksiyon sıcaklığı, süresi ve ultrasonikasyon gücü, Design Expert 10 (Stat-Ease Co., Minneapolis, ABD) istatistik programı kullanılarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon sonunda elde edilen misella (ketencik, yağ ve çözücü karışımı) 5800 rpm hızla 15 dakika santrifüj (Centurion, Benchtop centrifuges C2006, İngiltere) edilerek katı faz ayrılmıştır. Ardından üst fazda bulunan hekzan, rotary evaporatörde (Heildolph, Hei-VAP(EU), Almanya) uçurulmuş ve daha sonra elde edilen ketencik yağında mevcut olabilecek çözücü kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla örnekler 50°C sıcaklıktaki etüvde (Daihan, Wisecube WIG-105, Kore) 2 saat bekletilmiştir.

Sokslet yöntemi ile yağ ekstraksiyonu AACC Metot 30-25'te belirtilen yöntemle yapılmıştır (AACC, 2000).

#### Ketencik tohumundan yağ ekstraksiyonu deneme deseni

Araştırmada uygulanan ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenler olarak ekstraksiyon sıcaklığı ( $X_1$ ), süresi ( $X_2$ ) ve ultrasonikasyon gücü ( $X_3$ ) seçilmiş olup, deneme planı ise yüzey merkezli merkezi kompozit tasarıma (face-centred central composite design, FCCD) göre oluşturulmuştur. Buna göre bağımsız değişkenlerin maksimum, minimum ve orta noktaları Çizelge 1'de gösterilmiştir. Bağımsız değişkenlerin sınır değerlerine literatürde bildirilen çalışmalar göz önünde bulundurularak karar verilmiştir (Samaram vd., 2015; Tekin vd., 2015; Tontul vd., 2018). Üç faktör ile üç seviyeli oluşturulan tasarımın merkez noktasında yapılan üç tekrarla birlikte toplam 17 farklı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Araştırmada yağ verimi, peroksit sayısı ve konjuge dien değerleri bağımlı değişkenler olarak seçilmiştir.

Çizelge 1. Ketencik yağının ultrason destekli ekstraksiyonunda kullanılan parametrelerin değerleri  
 Table 1. Values of parameters used in ultrasound assisted extraction of camelina oil

| Bağımsız değişkenler<br><i>Independent variables</i> |       | En düşük (-1)<br><i>Minimum (-1)</i> | Merkez (0)<br><i>Center (0)</i> | En yüksek (+1)<br><i>Maximum (+1)</i> |
|--|-------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Sıcaklık/ <i>Temperature</i> (°C)                    | $X_1$ | 30                                   | 45                              | 60                                    |
| Süre/ <i>Time</i> (dk/ <i>min</i> )                  | $X_2$ | 15                                   | 30                              | 45                                    |
| Güç/ <i>Power</i> (%)                                | $X_3$ | 30                                   | 65                              | 100                                   |

### Yağ veriminin belirlenmesi

Yağ verimi, uygulanan ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen yağ ağırlığının başlangıçta kullanılan tohumun ağırlığına oranı şeklinde değerlendirilmiş ve tohumların kuru madde miktarı dikkate alınarak g/100g olarak hesaplanmıştır.

### Peroksit sayısı analizi

Ketencik yağı örneklerinin peroksit sayısı değeri, AOCS Metot Cd8-53'te belirtildiği şekilde 1 kg yağda bulunan peroksit oksijeninin mili eşdeğer oksijen cinsinden değeri (meqO<sub>2</sub>/kg yağ) olarak hesaplanarak verilmiştir (AOCS, 2004).

### Konjuge dien analizi

Ketencik yağı örneklerinin konjuge dien (K<sub>232</sub>) değeri AOCS Metot Ch5-91'de belirtildiği şekilde UV/VIS spektrofotometre (Shimadzu, UV-VIS Spektrofotometre, UV-1280, Japonya) kullanılarak 232 nm dalga boyunda belirlenmiştir (AOCS, 2004).

### Yağ asidi profili analizi

Örneklerin yağ asidi metil esterleri ISO metot 12966-2:2017'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır (ISO, 2017). Buna göre yaklaşık 0.1 g yağ örneği tartılarak üzerine 10 mL *n*-hekzan ve 0.5 mL 2N metanol ile hazırlanmış KOH çözeltisi eklendikten sonra karıştırılmıştır. Karışımın üst faz kısmı berrak bir görünüm alıncaya kadar karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletilmiş ve berrak kısımdan alınan örnek analiz edilmiştir. Ketencik yağ asidi profili gaz kromatografisi sisteminde (Shimadzu, GC-2025, Japonya), kapiler kolon (60 m×0.25 mm×0.20 µm, Rtx-2330, USA) ve FID dedektör kullanılarak belirlenmiştir. Analizde kolon sıcaklığı 190°C, enjeksiyon bloğu sıcaklığı 230°C ve dedektör sıcaklığı 250°C olarak ayarlanmıştır. Ayrıca taşıyıcı

gazın (helyum) akış hızı 0.67 mL/dk ve split oranı 25:1 olarak uygulanmıştır.

### Hızlandırılmış oksidasyon analizi

Hızlandırılmış oksidasyon testi Kıralan vd. (2018) tarafından belirtilen yönteme göre 60°C sıcaklığındaki etüvde 10 gün süresince gerçekleştirilmiştir. Yağ örnekleri (yaklaşık 2.50 g) her bir depolama süresi için ayrı ayrı tüplere konulmuş ve ağızları hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Depolama süresince örneklerin peroksit sayısı ve konjuge dien değerlerindeki değişimleri takip edilmiştir.

### İstatistiksel analiz

Belirtilen deneme tasarımı kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında, her bir bağımlı değişken için doğrusal, 2FI, kuadratik ve kübik modellere göre Design Expert 10 (Stat-Ease Inc. USA) programı kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. Modellerin değerlendirmesinde *p* değeri, uyum eksikliği değeri (lack-of-fit), R<sup>2</sup> ve düzeltilmiş R<sup>2</sup> değerleri kullanılmış ve *p* değeri istatistiksel olarak önemli (*p*<0.05), uyum eksikliği değeri istatistiksel olarak önemsiz (*p*>0.05) ve R<sup>2</sup> değerleri 1'e ve birbirine yakın olan model en uygun model olarak belirlenmiştir. Ayrıca, belirlenen modelin tahmin gücünün artırılması amacıyla modelde bulunan ve istatistiksel olarak önemsiz (*p*>0.05) olan katsayılar modelden çıkarılmıştır. Optimum ultrasonikasyon destekli ekstraksiyon koşulu olarak; verimin maksimize, konjuge dien değerinin minimize olacağı ve uygulanacak sıcaklık değerinin deneme deseninde kullanılan aralıkta (30-60°C), sürenin ve ultrasonikasyon gücünün ise minimize olacağı şartlar belirlenmiştir. Belirlenen bu şartlarda ketencik yağı ekstrakte edilmiş ve verim ile konjuge dien değerleri deneysel olarak belirlenerek optimum koşula ait teorik değer ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmadaki tüm analizler en az 2 paralelli olarak yapılmış ve tutarlı bulunmayan tüm sonuçlar tekrarlanmıştır. Sonuçlar örnek kuru maddesi üzerinden hesaplanmış ve “ortalama  $\pm$  standart hata” olarak sunulmuştur.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Yağ ekstraksiyonu optimizasyonuna ait bulgular

Ketencik tohumundan ultrasonikasyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonu için uygulanan merkezi

kompozit deneme deseni ve analiz verileri Çizelge 2’de verilmiştir. Deneme deseninin yanıtı olan ve Çizelge 2’de verilen verilere ait istatistiksel analiz sonuçları değerlendirildiğinde kuadratik modelin deneme şartlarında verim değerleri için istatistiksel olarak önemli ( $p<0.01$ ) olduğu, ancak örneklerle ait peroksit ve konjuge dien düzeylerinin uygulanan farklı koşullardan istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilenmediği ( $p>0.05$ ) tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Ketencik tohumundan ultrasonikasyon yöntemi ile yağ ekstraksiyonu için uygulanan merkezi kompozit deneme deseni ve analiz verileri

Table 2. Central composite trial design and analysis data applied for oil extraction from camelina seed by ultrasonication method

| Deneme no<br>Run | Sıcaklık/ $X_1$<br>(°C)<br>Temperature/ $X_1$<br>(°C) | Süre/ $X_2$<br>(dk)<br>Time/ $X_2$<br>(min) | Güç/ $X_3$<br>(%)<br>Power/ $X_3$<br>(%) | Verim<br>(g/100g)<br>Yield<br>(g/100g) | Peroksit<br>(meqO <sub>2</sub> /kg yağ)<br>Peroxide<br>(meqO <sub>2</sub> /kg oil) | Konjuge dien<br>Conjugated diene |
|------------------|---|---|--|--|--|----------------------------------|
| 1                | 30  | 45  | 100                                      | 29.21                                  | 3.19   | 1.81                             |
| 2                | 60  | 45  | 100                                      | 20.48                                  | 4.28   | 2.21                             |
| 3                | 60  | 30  | 65                                       | 25.84                                  | 2.47   | 1.91                             |
| 4                | 45  | 30  | 100                                      | 30.80                                  | 2.85   | 1.84                             |
| 5                | 30  | 45  | 30                                       | 27.56                                  | 3.58   | 1.83                             |
| 6                | 30  | 15  | 100                                      | 26.97                                  | 2.85   | 1.30                             |
| 7                | 45  | 30  | 65                                       | 29.65                                  | 3.19   | 1.94                             |
| 8                | 60  | 15  | 30                                       | 27.61                                  | 3.20   | 2.00                             |
| 9                | 45  | 15  | 65                                       | 28.78                                  | 3.19   | 1.83                             |
| 10               | 45  | 30  | 65                                       | 28.95                                  | 3.18   | 1.92                             |
| 11               | 30  | 30  | 65                                       | 27.74                                  | 2.14   | 1.86                             |
| 12               | 45  | 30  | 65                                       | 29.10                                  | 3.21   | 1.90                             |
| 13               | 45  | 45  | 65                                       | 28.43                                  | 2.49   | 2.12                             |
| 14               | 45  | 30  | 30                                       | 27.53                                  | 2.11   | 2.03                             |
| 15               | 30  | 15  | 30                                       | 27.43                                  | 1.40   | 1.78                             |
| 16               | 60  | 15  | 100                                      | 23.86                                  | 2.47   | 2.10                             |
| 17               | 60  | 45  | 30                                       | 27.40                                  | 2.30   | 2.00                             |

Elde edilen analiz sonuçlarına göre; yağ ekstraksiyonu üretim veriminin 20.48-30.80 g/100g aralığında değiştiği ve en yüksek ekstraksiyon veriminin 45°C sıcaklıkta, 30 dakika süresince ve %100 güç ile gerçekleştirilen 4 numaralı deneme ile sağlandığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada nar çekirdeğinden ultrasonikasyon tekniği ile elde edilen en yüksek yağ veriminin %19.53-25.17 aralığında değiştiği ve en yüksek verimin 40°C ekstraksiyon sıcaklığı, 36 dakika ekstraksiyon süresi ve 140W ultrasonik

gücü koşullarında elde edildiği bildirilmiştir (Tian vd., 2013). Bir diğer çalışmada ise çiya tohumundan 45°C sıcaklık, 20 dakika ekstraksiyon süresi ve %80 ultrasonikasyon gücü uygulamasında %49.45 değeri ile en yüksek düzeyde yağ veriminin elde edildiği rapor edilmiştir (Tontul vd., 2018). Optimizasyon koşulları arasındaki farklılıkların örnekler arasındaki yapısal ve kimyasal farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ekstraksiyon veriminin sıcaklık, güç, süre gibi uygulanan farklı



koşulların yanı sıra örneğin nem içeriğine, örnek matrisinin doğasına, ekstrakte edilen analitin matris içindeki durumuna, örnek partikül boyutuna, örnek miktarına ve kullanılan cihaza bağlı olarak farklılık gösterebildiği belirtilmiştir (Büyüktuncel, 2012).

Peroksit ve konjuge dien değerleri yağlarda birincil oksidasyonun belirlenmesi amacıyla kullanılan parametreler olup (Pratap Singh vd., 2020), bu değerlerin oksidasyon düzeyindeki artışa bağlı olarak yükseldiği ifade edilmiştir (Kıralan vd., 2019). Farklı koşullarda gerçekleştirilen denemelere ait peroksit ve konjuge dien analiz sonuçlarının sırasıyla 1.40-4.28 meqO<sub>2</sub>/kg yağ ve 1.30-2.21 aralıklarında olduğu belirlenmiştir. En düşük peroksit sayısı ve konjuge dien değerlerinin en düşük sıcaklık ve süre uygulamalarında elde edildiği, ancak uygulanan parametrelerin peroksit sayısı ve konjuge dien değerleri üzerinde önemli bir farklılık oluşturmadığı belirlenmiştir ( $p>0.05$ ).

Yapılan bir çalışmada ultrasonikasyon ile papaya çekirdeklerinden yağ ekstraksiyonunda peroksit değerinin sıcaklık, ultrasonikasyon gücü ve çözücü-örnek oranı ve bu değişkenlerin interaksiyonlarından etkilenmediği, yalnızca ekstraksiyon süresinin peroksit değeri üzerinde önemli bir etki gösterdiği bildirilmiştir. Ekstraksiyon süresinin kuadratik etkisinin peroksit değerlerini negatif yönde etkilediği ifade edilmiştir (Samaram vd., 2015). Bir diğer çalışmada ise *Pelvetia canaliculata* katkılanmış ayçiçeği yağlarına uygulanan ultrasonikasyon işlem süresinin konjuge dien değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisinin bulunmadığı belirtilmiştir (Sousa vd., 2021).

Verim değerlerine uygun olarak belirlenen kuadratik modelin ve istatistiksel olarak önemli olan bağımsız değişkenlerin seçilmesi ile gerçekleştirilen varyans analizi ve çoklu regresyon istatistik değerlerine ait sonuçlar Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Bağımsız değişkenlerin yağ ekstraksiyon verimi üzerine etkisini gösteren varyans ve regresyon analizlerine ait bulgular

| Varyasyon kaynağı/<br><i>source</i>                    | Variation | KT/ Sum of<br><i>squares</i> | SD/Standard<br><i>deviation</i> | KO/Mean<br><i>of squares</i> | p-değeri/ <i>p-value</i> |
|--|-----------|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Model  |           | 68.63                        | 4                               | 17.16                        | 0.0013**                 |
| X <sub>1</sub>   |           | 18.83                        | 1                               | 18.83                        | 0.0083*                  |
| X <sub>3</sub>   |           | 3.87                         | 1                               | 3.87                         | 0.1779                   |
| X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>                          |           | 17.57                        | 1                               | 17.57                        | 0.0101*                  |
| X <sub>1</sub> <sup>2</sup>                            |           | 28.36                        | 1                               | 28.36                        | 0.0022**                 |
| Artık hata/ <i>Residual</i>                            |           | 22.66                        | 12                              | 1.89                         |                          |
| Uyum eksikliği/ <i>Lack of fit</i>                     |           | 22.39                        | 10                              | 2.24                         | 0.0587                   |
|  |           | Değer/ <i>Value</i>          |                                 |                              |                          |
| R <sup>2</sup>   |           | 0.75                         |                                 |                              |                          |
| Düzeltilmiş R <sup>2</sup> /Adjusted R <sup>2</sup>    |           | 0.67                         |                                 |                              |                          |
| Tahmin edilen R <sup>2</sup> /Predicted R <sup>2</sup> |           | 0.42                         |                                 |                              |                          |
| Yeterli hassasiyet/<br><i>Adequate<br/>precision</i>   |           | 9.02                         |                                 |                              |                          |

X<sub>1</sub>: sıcaklık/temperature, X<sub>2</sub>: süre/time, X<sub>3</sub>: güç/power, KT: kareler toplamı, SD: serbestlik derecesi, KO: kareler ortalaması, \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$

Çizelge 3'te verilen varyans analizi verilerine göre ekstraksiyon sıcaklığının, sıcaklık ve güç interaksiyonunun ve kuadratik olarak sıcaklığın yağ ekstraksiyon verimi üzerinde önemli düzeyde etkili ( $p<0.01$ ;  $p<0.05$ ) olduğu belirlenmiştir.

Kullanılan deneme deseninde yağ ekstraksiyon veriminin kuadratik model ile iyi bir uyum ( $R^2 = 0.75$ ) içerisinde olduğu değerlendirilmiştir. Modelin anlamlılığı ve kabul edilebilirliği için regresyon katsayısının 0.75 değeri ve üzerinde

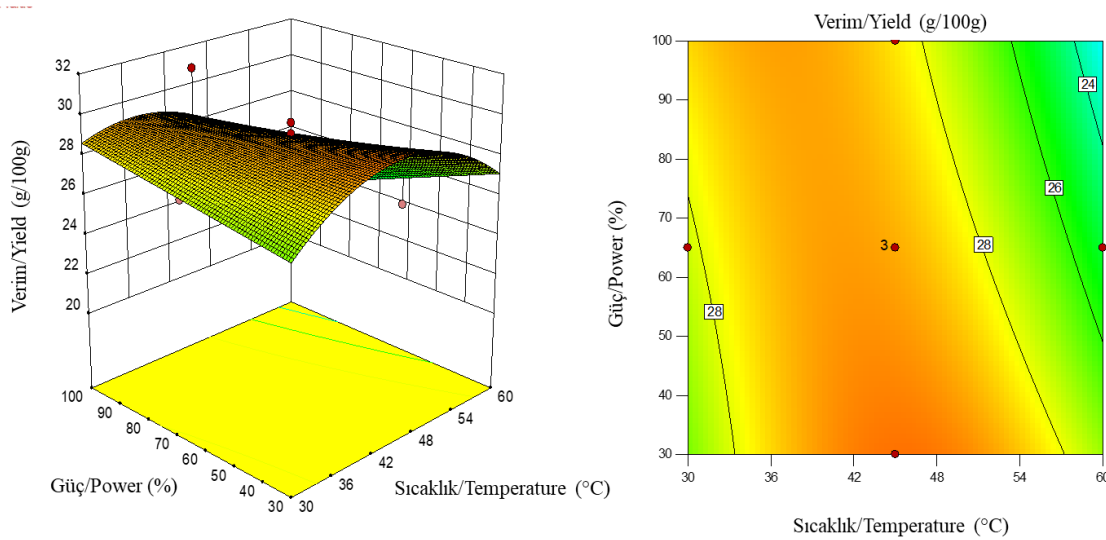
olması gerektiği bildirilmiştir (Mohammadpour vd., 2019). Yeterli hassasiyet değerinin 9.02 ile sınır değer olan 4 değerinden büyük olması da modelin uygunluğunu ve gürültüden etkilenmediğini ifade etmektedir. Deneme koşullarında önemsiz bulunan değişkenler ihmal edildikten sonra önemli bulunan bağımsız değişkenlere göre oluşturulan yağ verimi eşitliği ise Eşitlik 1'de verilmiştir.

$$\text{Verim (g/100g)} = 29.03 - 1.37X_1 - 0.62X_3 - 1.48X_1X_3 - 2.62X_1^2 \quad \text{Eşitlik 1}$$

### Bağımsız değişkenlerin yağ ekstraksiyon verimi üzerine etkileri

Ultrasonikasyon yönteminde ekstraksiyon etkinliğinin, çözücünün türü ve konsantrasyonu ile işlem sıcaklığı, süresi ve ultrason dalgalarının frekansı gibi faktörlere bağlı olabileceği bildirilmiştir (Mwaurah vd., 2019). Uygulanan

deneme koşullarında ise yağ ekstraksiyon verimi üzerine ekstraksiyon sıcaklığının, sıcaklık-güç interaksyonunun ve sıcaklığın karesinin istatistiksel olarak önemli ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ) bir etkisinin olduğu, ancak ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimini etkilemediği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada ultrasonikasyon süresinin 5 dakikadan 15 dakikaya çıkarılmasının *Moringa oleifera* çekirdeklerinden yağ ekstraksiyon verimini artırdığı ancak verim değerinin 5 dakikadan sonra önemli bir oranda değişmediği belirtilmiştir (Zhong vd., 2018). Bir diğer araştırmada ise 20 dakika ultrasonikasyon uygulama süresinden sonra perilla yağı ekstraksiyon veriminin yaklaşık aynı olduğu rapor edilmiştir (Li vd., 2015). Önemli bulunan bağımsız değişkenlerin yağ ekstraksiyon verimi üzerine etkisi Şekil 1'de verilen grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 1. Bağımsız değişkenlerin yağ ekstraksiyon verimi üzerine etkisi  
Figure 1. Effect of independent variables on oil extraction efficiency

Yağ ekstraksiyon veriminin sıcaklık artırıldıkça yaklaşık orta nokta değerine doğru arttığı ancak bu değerden sonra azalma eğilimi gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca sadece güç değişimi ile önemli düzeyde farklılık göstermeyen yağ ekstraksiyon veriminin, ortalama sıcaklık değerinde uygulanan ultrasonikasyon gücünün yükseltilmesi ile artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Sıcaklığın verim üzerindeki bu değişen etkisinin akustik kaviteasyonun yoğunluğunu etkileyen buhar basıncındaki değişim ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ultrasonikasyon düşük sıcaklık değerlerinde daha az kabarcık ve buhar basıncı oluşumuna neden olurken, bu durumun sonucunda kabarcık ara yüzeylerinde oluşan yüksek basınç farkı nedeniyle kabarcıklarda daha

büyük bir kuvvetle patlama gerçekleşerek bozulan hücre dokularından daha fazla yağ ekstrakte edilebilmektedir. Ancak daha yüksek sıcaklık değerlerinde kabarcıkların içi ve dışı arasında küçük bir basınç farkı meydana geldiğinden kabarcıklar daha az kuvvetle patlamakta ve hücre dokusunun daha düşük düzeyde tahrip edilmesi ile yağ ekstraksiyonu azalmaktadır (Mohammadpour vd., 2019). Yapılan bir çalışmada ultrasonikasyon işlem sıcaklığının 20°C değerinden 40°C değerine artırılması ile ekstraksiyon veriminin yükseldiği, ancak 40°C değerinden 60°C değerine yapılan artış ile yağ ekstraksiyon veriminde azalma meydana geldiği rapor edilmiştir (Li vd., 2015).

Ultrasonikasyon gücündeki artışın yağ ekstraksiyon verimini arttırmasının, ultrason probunun mekanik titreşimi ile katı ve sıvı fazlar arasında daha geniş temas yüzey alanının oluşmasının sonucu olabileceği rapor edilmiştir (Samaram vd., 2015). Ultrasonikasyon ile meydana gelen titreşim, çözücünün numune matrisine daha fazla ve daha kolay nüfuz etmesine neden olmakta ve artan hidrodinamik kuvvet etkisiyle hücre duvarı kolayca bozularak yağ

ekstraksiyon veriminde artış olmaktadır (Pan vd., 2012; Samaram vd., 2015). Yapılan bir çalışmada ultrasonikasyon gücünün 300W değerinden 400W değerine artırılması ile ekstraksiyon veriminin yükseldiği, ancak 400W değerinden 500W değerine yapılan artış ile yağ ekstraksiyon veriminde bir miktar azalma ile birlikte önemli bir farklılık olmadığı bildirilmiştir (Li vd., 2015). Bir diğer çalışmada ise papaya çekirdeklerinden yağ ekstraksiyonunda ultrasonikasyon gücünün 700W değerine kadar yükseltilmesinin ekstraksiyon verimini artırdığı rapor edilmiştir (Samaram vd., 2015).

#### **Optimum yağ ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi, doğrulanması ve analiz sonuçları**

Ketencik tohumundan ultrasonikasyon ile yağ ekstraksiyonu için bağımsız değişkenler olarak kullanılan sıcaklık, süre ve ultrasonikasyon gücünün yağ verimi üzerine etkileri ve en yüksek istenebilirlik değeri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları ile elde edilmesi tahmin edilen ve denemeler sonucunda elde edilen yağ verimleri Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Optimum yağ ekstraksiyon koşulları ve elde edilmesi tahmin edilen ve denemeler sonucunda elde edilen yağ verimleri

Table 4. Optimum oil extraction conditions and estimated oil yields and obtained oil yields as a result of experiments

| Koşullar | Sıcaklık (°C)    | Süre (dk)  | Güç (%)   | Yağ verimi (g/100g) | Peroksit (meqO <sub>2</sub> /kg yağ) | Konjuge dien     | İstenebilirlik (%) |
|----------|------------------|------------|-----------|---------------------|--------------------------------------|------------------|--------------------|
| Run      | Temperature (°C) | Time (min) | Power (%) | Yield (g/100g)      | Peroxide (meqO <sub>2</sub> /kg oil) | Conjugated diene | Desirability (%)   |
| Optimum  | 38.16            | 15.00      | 30.00     | 29.06               | 2.18                                 | 1.83             | 92.80              |
| Deneme   | 38.16            | 15.00      | 30.00     | 24.44               | 2.15                                 | 1.79             | -                  |

Yağ verimi açısından optimum koşulların 38.16°C sıcaklık, 15 dakika ekstraksiyon süresi ve %30 ultrasonikasyon gücü olduğu belirlenmiştir. Bitkilerden ultrasonikasyon tekniği ile yağ ekstraksiyonunun cevap-yüzey metodu ile optimize edildiği farklı çalışmalarda papaya çekirdek yağı için optimum ultrasonikasyon sıcaklık, güç ve süresinin sırasıyla 62.5°C, 700W ve 38.5 dakika olarak belirlendiği (Samaram vd., 2015), perilla bitkisinden %36.27 verimle elde edilen yağ için optimum ekstraksiyon koşullarının

41.26°C sıcaklık ve 17.11 dakikalık bir ekstraksiyon süresi olduğu (Li vd., 2015), *Moringa peregrina* bitkisinden yağ ekstraksiyonunun optimizasyonunda en uygun sürenin 26.3 dakika olduğu (Mohammadpour vd., 2019) ve kapok tohumlarından yağ ekstraksiyonu için ise %82.6 genlik seviyesinde, 43.50°C sıcaklığında ve 9.8 dakika süresince yağ ekstraksiyonunun optimum şekilde gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir (Senrayan ve Venkatachalam, 2020).

Optimum koşullarda gerçekleştirilen denemelerden elde edilen yağ veriminin tahmin edilen değerden biraz daha düşük, konjuge dien ve peroksit değerlerinin ise tahmin edilen değerlere yakın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca belirlenen

optimum koşullarda ekstrakte edilen yağ, sokslet ekstraksiyonu ile elde edilen yağ örneği ile verim, peroksit, konjuge dien ve yağ asidi profili özellikleri açısından karşılaştırılmıştır. Elde edilen karşılaştırma bulguları Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Sokslet ve ultrasonikasyon yöntemleri ile ekstrakte edilen ketencik tohumu yağına ait bazı özellikler

Table 5. Some properties of camelina seed oil extracted by soxhlet and ultrasonication methods

| Analizler/Analyses  | Sokslet/<br>Soxhlet |        | Ultrasonikasyon/<br>Ultrasonication |   |      |
|---|---------------------|--------|-------------------------------------|---|------|
| Verim (g/100g)/Yield (g/100g)   | 38.83 <sup>a</sup>  | ± 2.81 | 24.44 <sup>b</sup>                  | ± | 4.39 |
| Peroksit (meqO <sub>2</sub> /kg yağ)/Peroxide (meqO <sub>2</sub> /kg oil) | 3.39 <sup>a</sup>   | ± 0.19 | 2.15 <sup>b</sup>                   | ± | 0.01 |
| Konjuge dien/Conjugated diene   | 2.14 <sup>a</sup>   | ± 0.01 | 1.79 <sup>b</sup>                   | ± | 0.03 |
| Yağ asidi profili (%)/Fatty acid profile (%)                              |                     |        |                                     |   |      |
| Miristik asit/Miristic acid   | 0.07 <sup>Ha</sup>  | ± 0.00 | 0.07 <sup>Ha</sup>                  | ± | 0.00 |
| Palmitik asit/Palmitic acid   | 6.60 <sup>Ea</sup>  | ± 0.01 | 6.42 <sup>Ea</sup>                  | ± | 0.02 |
| Palmitoleik asit/Palmitoleic acid   | 0.11 <sup>Ha</sup>  | ± 0.00 | 0.11 <sup>Ha</sup>                  | ± | 0.00 |
| Heptadekanoik asit/Heptadecanoic acid                                     | 0.05 <sup>Ha</sup>  | ± 0.00 | 0.05 <sup>Ha</sup>                  | ± | 0.00 |
| cis-10-heptadekanoik asit/cis-10-heptadecanoic acid                       | 0.04 <sup>Ha</sup>  | ± 0.00 | 0.04 <sup>Ha</sup>                  | ± | 0.00 |
| Stearik asit/Stearic acid   | 2.80 <sup>Fa</sup>  | ± 0.00 | 2.77 <sup>Fa</sup>                  | ± | 0.00 |
| Oleik asit/Oleic acid   | 20.89 <sup>Ca</sup> | ± 0.07 | 20.84 <sup>Ca</sup>                 | ± | 0.03 |
| Linoleik asit/Linoleic acid   | 23.95 <sup>Ba</sup> | ± 0.09 | 23.61 <sup>Ba</sup>                 | ± | 0.00 |
| Araşidik asit/Arachidic acid  | 1.74 <sup>Ga</sup>  | ± 0.01 | 1.75 <sup>Ga</sup>                  | ± | 0.00 |
| Linolenik asit/Linolenic acid   | 28.56 <sup>Aa</sup> | ± 0.11 | 28.78 <sup>Aa</sup>                 | ± | 0.03 |
| cis-11-eikosenoik asit/cis-11-eicosenoic acid                             | 15.19 <sup>Da</sup> | ± 0.07 | 15.55 <sup>Da</sup>                 | ± | 0.02 |

Verilerde aynı sütunda yer alan ortalamalar arasındaki farklılıkları belirtmek için büyük harfler (A, B, C vd.), aynı satırda yer alan ortalamalar arasındaki farklılıkları belirtmek için ise küçük harfler (a, b, c vd.) kullanılmıştır.

Capital letters (A, B, C, etc.) were used to indicate the differences between the means in the same column, and small letters (a, b, c, etc.) were used to indicate the differences between the means in the same row in the data.

Sokslet yöntemi ile elde edilen yağın verim, peroksit ve konjuge dien değerlerinin, ultrasonikasyon ile elde edilen yağa ilişkin değerlerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ultrasonikasyon ekstraksiyonundan elde edilen papaya tohumu yağının maksimum ekstraksiyon veriminin, uygulanan farklı ekstraksiyon koşullarının bir sonucu olarak solvent ekstraksiyonundan elde edilen verimden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Samaram vd., 2013; Samaram vd., 2015). Ayrıca yapılan bir araştırmada ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen *Moringa peregrina* yağının peroksit değerinin, sokslet yöntemi ile elde edilen yağa göre nispeten daha düşük olduğu ve bu durumun ultrasonikasyon ile ekstrakte edilen yağın antioksidan aktivitesinin ve toplam fenolik madde

içeriğinin de daha yüksek olması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Mohammadpour vd., 2019).

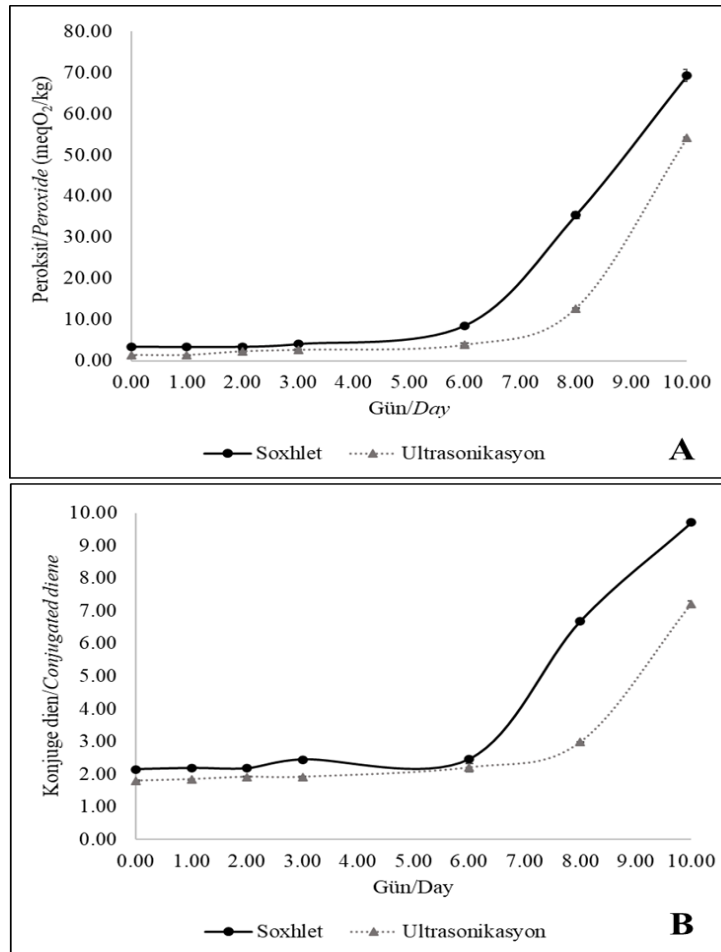
Yağ asidi profiline ait sonuçlar incelendiğinde ultrasonikasyon yöntemi ile ekstrakte edilen ketencik tohumu yağında miristik (%0.07), palmitik (%6.42), palmitoleik (%0.11), heptadekanoik (%0.05), cis-10-heptadekanoik (%0.04), stearik (%2.77), oleik (%20.84), linoleik (%23.61), araşidik (%1.75), linolenik (%28.78) ve cis-11-eikosenoik (%15.55) asitlerin bulunduğu ve hakim yağ asitlerinin ise sırasıyla linolenik, linoleik, oleik ve cis-11-eikosenoik asitlerin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her iki ekstraksiyon yöntemi arasında ise yağ asidi kompozisyonu ve bu asitlerin oranları arasında önemli bir farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ) tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada ketencik yağının soğuk sıkım ve hekzan

ekstraksiyonu yöntemleri ile ayrılması sonucu yağ asidi kompozisyonunda bir değişiklik olmadığı, ketencik yağının  $\alpha$ -linolenik (%32.50), linoleik (%18.10) ve oleik (%14.80) asitler açısından zengin olduğu ve linolenik asitçe zengin olması nedeniyle ketencik yağının sağlığı geliştirici özellikler açısından bir potansiyel taşıdığı bildirilmiştir (Kıralan vd., 2018).

### Oksidasyon analiz sonuçları

Soksalet ve ultrasonikasyon yöntemleri ile ekstrakte edilen ketencik tohumu yağına ait oksidasyon sonuçları Şekil 2'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre 6. güne kadar her iki yöntem ile elde edilen yağların oksidasyon seviyelerinde önemli bir farklılık meydana gelmezken, 6.

günden sonraki günlerde yağ örnekleri hızlı bir şekilde oksidasyona uğramıştır. Ketencik tohumu yağının oleik, linoleik ve linolenik asitler gibi doymamış yağ asitleri açısından zengin olması nedeniyle oksidasyona karşı hassas olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca soksalet yöntemi ile ekstrakte edilen yağların oksidasyon seviyelerinin, ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen yağ örneklerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ekstrakte edilen yağlar arasındaki oksidasyon farklılıklarının yağ ekstraksiyonu sırasında yağ ile birlikte ayrılan polar lipidler, steroller, tokoller ve fenolik bileşikler gibi antioksidatif etkiye sahip biyoaktif bileşiklerin miktarlarındaki farklılıklar ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Kıralan vd., 2018).



Şekil 2. Soksalet ve ultrasonikasyon yöntemleri ile ekstrakte edilen ketencik tohumu yağına ait oksidasyon sonuçları

Figure 2. Oxidation results of camelina seed oil extracted by soxhlet and ultrasonication methods

Soksalet yöntemi ile elde edilen yağların peroksit ve konjuge dien değerlerinin sırasıyla 3.39-69.25 meqO<sub>2</sub>/kg yağ ve 2.14-9.71 ve ultrasonikasyon metodu ile elde edilen yağların peroksit ve konjuge dien değerlerinin ise sırasıyla 2.15-54.19 meqO<sub>2</sub>/kg yağ ve 1.79-7.22 aralıklarında olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada soğuk sıkım ve hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen ketencik tohumu yağlarının oksidasyonlarının depolama ile artış gösterdiği, soğuk sıkım ile elde edilen yağların 10 günlük depolama sonunda peroksit değerlerinin 3.57 meqO<sub>2</sub>/kg yağ değerinden 107.30 meqO<sub>2</sub>/kg yağ değerine ve hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen yağların depolama sonunda peroksit değerlerinin ise 4.32 meqO<sub>2</sub>/kg yağ değerinden 11.20 meqO<sub>2</sub>/kg yağ değerine yükseldiği rapor edilmiştir (Kıralan vd., 2018). Bir diğer çalışmada ise ketencik yağının başlangıçta 3.00 meqO<sub>2</sub>/kg olan yağ peroksit değerlerinin 10. günün sonunda 48.10 meqO<sub>2</sub>/kg yağ değerine yükseldiği, konjuge dien absorbans değerinin ise sekizinci depolama gününden sonra belirgin bir artış gösterdiği ve bu değerlerin kolza tohumu, susam, ayçiçeği, mısır ve zeytin yağlarına göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Eidhin vd., 2003).

### SONUÇ

Esansiyel yağ asitlerini ve çeşitli biyoaktif bileşikleri yüksek düzeyde içermesi sebebiyle ketencik yağı, insan beslenmesi için değerli bir kaynak olarak görülmektedir. Son yıllarda ketencik yağına artan ilgi sebebiyle, tohumdan daha yüksek verim ile yağ elde edilebilmesi önemli bir konu haline gelmiştir. Bu doğrultuda gerçekleştirilen çalışmada, ketencik tohumundan yüksek verim ile iyi kalitede yağ elde edilebilmesi amacıyla ultrasonikasyon yöntemi kullanılmıştır. Cevap yüzey metoduna göre verimin en yüksek olduğu (%24.44) optimum ekstraksiyon parametrelerinin; 38.16°C sıcaklık, 15 dk ekstraksiyon süresi ve %30 ultrasonikasyon gücü olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen ketencik yağının peroksit ve konjuge dien değerleri ise sırasıyla 2.15 meqO<sub>2</sub>/kg yağ ve 1.79 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, ultrasonikasyon yöntemi ile elde edilen yağın verim, peroksit ve konjuge dien değerlerinin; soksalet yöntemi ile elde edilen yağla ilişkin

değerlerden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, soksalet yöntemi kullanılarak elde edilen ketencik yağı ile karşılaştırıldığında, ultrasonikasyon yöntemi ile ekstrakte edilen yağın daha yavaş oksidasyona uğradığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ketencik tohumundan yağ ekstraksiyonunda ultrasonikasyon yönteminin alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği ve bu yağın oksidasyon özellikleri ve omega yağ asidi içeriği bakımından fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılma potansiyelinin bulunduğu değerlendirilmiştir.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların bu araştırma ile ilgili olarak herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması yoktur.

### YAZAR KATKILARI

Bu araştırmanın yürütülmesinde, üretim denemeleri ve analizlerin gerçekleştirilmesinde ve makalenin yazılmasında yazarlar eşit olarak katkı sağlamıştır.

### TEŞEKKÜR

Araştırmaya verdiği destek nedeniyle Prof. Dr. Mustafa KIRALAN'a teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

- AACC. (2000). Approved methods of American association of cereal chemists 10th ed. American Association of Cereal Chemists Inc., Minnesota, USA.
- Abramovič, H., Butinar, B., Nikolič, V. (2007). Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. *Food Chemistry*, 104(3), 903-909.
- AOCS. (2004). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society 5th ed. AOCS. Champaign, IL.
- Berti, M., Gesch, R., Eynck, C., Anderson, J., Cermak, S. (2016). Camelina uses, genetics, genomics, production, and management. *Industrial Crops and Products*, 94, 690-710.

- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2, 209-242.
- Eidhin, D.N., Burke, J., O'Beirne, D. (2003). Oxidative stability of  $\omega$ 3-rich camelina oil and camelina oil-based spread compared with plant and fish oils and sunflower spread. *Journal of Food Science*, 68(1), 345-353.
- Goula, A.M., Papatheodorou, A., Karasavva, S., Kaderides, K. (2018). Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pomegranate seeds. *Waste and Biomass Valorization*, 9(1), 1-11.
- Haji Heidari, S., Taghian Dinani, S. (2018). The study of ultrasound-assisted enzymatic extraction of oil from peanut seeds using response surface methodology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(3), 1700252.
- Hernández-Santos, B., Rodríguez-Miranda, J., Herman-Lara, E., Torruco-Uco, J.G., Carmona-García, R., Juárez-Barrientos, J.M., Chávez-Zamudio, R., Martínez-Sánchez, C.E. (2016). Effect of oil extraction assisted by ultrasound on the physicochemical properties and fatty acid profile of pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 429-436.
- Hu, B., Li, Y., Song, J., Li, H., Zhou, Q., Li, C., Zhang Z, Liu Y, Liu A, Zhang Q, Liu S, Luo, Q. (2020). Oil extraction from tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) using the combination of microwave-ultrasonic assisted aqueous enzymatic method-design, optimization and quality evaluation. *Journal of Chromatography A*, 1627, 461380.
- ISO. (2017). ISO Standard No: 12966-2:2017. Animal and vegetable fats and oils-gas chromatography of fatty acid methyl esters-Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. <https://www.iso.org/standard/72142.html> (Accessed: 16 January 2023).
- Jalili, F., Jafari, S.M., Emam-Djomeh, Z., Malekjani, N., Farzaneh, V. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from canola seeds with the use of response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 11(2), 598-612.
- Kıralan, M., Kıralan, S.S., Subaşı, I., Aslan, Y., Ramadan, M.F. (2018). Fatty acids profile and stability of camelina (*Camelina sativa*) seed oil as affected by extraction method and thermal oxidation. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, XCV.
- Kıralan, M., Çalik, G., Kıralan, S., Özyaydin, A., Özkan, G., Ramadan, M.F. (2019). Stability and volatile oxidation compounds of grape seed, flax seed and black cumin seed cold-pressed oils as affected by thermal oxidation. *Grasas y Aceites*, 70(1), 295-295.
- Kurt, O., Seyis, F. (2008). Alternatif yağ bitkisi: ketencik [*Camelina sativa* (L.) Crantz]. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(2), 116-120.
- Leclère, M., Lorent, A.R., Jeuffroy, M.H., Butier, A., Chatain, C., Loyce, C. (2021). Diagnosis of camelina seed yield and quality across an on-farm experimental network. *European Journal of Agronomy*, 122, 126190.
- Liu, W., Fu, Y.J., Zu, Y.G., Tong, M.H., Wu, N., Liu, X.L., Zhang, S. (2009). Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from *Opuntia dillenii* Haw. and its antioxidant activity. *Food Chemistry*, 114(1), 334-339.
- Li, H.Z., Zhang, Z.J., Hou, T.Y., Li, X.J., Chen, T. (2015). Optimization of ultrasound-assisted hexane extraction of perilla oil using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 76, 18-24.
- Li, Z., Liu, Y., Liang, Y., Wang, H., Yang, F. (2023). Study of the optimization and kinetics of the surfactant-induced ultrasonic-assisted extraction of perilla seed oil: Free radical scavenging capacity and physicochemical and functional characteristics. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 32, 100977.
- Mohammadpour, H., Sadrameli, S.M., Eslami, F., Asoodeh, A. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Industrial Crops and Products*, 131, 106-116.
- Mondor, M., Hernández-Álvarez, A.J. (2021). *Camelina sativa* composition, attributes, and

- applications: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 124(3), 2100035.
- Moradi, N., Rahimi, M., Moeini, A., Parsamoghadam, M.A. (2018). Impact of ultrasound on oil yield and content of functional food ingredients at the oil extraction from sunflower. *Separation Science and Technology*, 53(2), 261-276.
- Mwaurah, P.W., Kumar, S., Kumar, N., Attkan, A.K., Panghal, A., Singh, V.K., Garg, M.K. (2020). Novel oil extraction technologies: Process conditions, quality parameters, and optimization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(1), 3-20.
- Opreescu, E.E., Enascuta, C.E., Radu, E., Ciltea-Udrescu, M., Lavric, V. (2022). Does the ultrasonic field improve the extraction productivity compared to classical methods—maceration and reflux distillation?. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 179, 109082.
- Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G.G., McHugh, T.H. (2012). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 365-372.
- Perrier, A., Delsart, C., Boussetta, N., Grimi, N., Citeau, M., Vorobiev, E. (2017). Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 58-65.
- Piravi-vanak, Z., Azadmard-Damirchi, S., Kahrizi, D., Mooraki, N., Ercisli, S., Savage, G.P., Ahmadvandi, H.R., Martinez, F. (2022). Physicochemical properties of oil extracted from camelina (*Camelina sativa*) seeds as a new source of vegetable oil in different regions of Iran. *Journal of Molecular Liquids*, 345, 117043.
- Popa, A.L. (2017). *Camelina sativa* oil—a review. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 21, 233-238.
- Pratap Singh, A., Fathordoobady, F., Guo, Y., Singh, A., Kitts, D.D. (2020). Antioxidants help favorably regulate the kinetics of lipid peroxidation, polyunsaturated fatty acids degradation and acidic cannabinoids decarboxylation in hempseed oil. *Scientific Reports*, 10(1), 10567.
- Rajendran, N., Gurunathan, B., Ebenezer Selvakumari, I.A. (2021). Optimization and technoeconomic analysis of biooil extraction from *Calophyllum inophyllum* L. seeds by ultrasonic assisted solvent oil extraction. *Industrial Crops and Products*, 162, 113273.
- Rojo-Gutiérrez, E., Carrasco-Molinar, O., Tirado-Gallegos, J.M., Levario-Gómez, A., Chávez-González, M.L., Baeza-Jiménez, R., Buenrostro-Figueroa, J.J. (2021). Evaluation of green extraction processes, lipid composition and antioxidant activity of pomegranate seed oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 2098-2107.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C.P., Ghazali, H.M. (2013). Ultrasound-assisted extraction (UAE) and solvent extraction of papaya seed oil: Yield, fatty acid composition and triacylglycerol profile. *Molecules*, 18(10), 12474-12487.
- Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C.P., Ghazali, H.M., Bordbar, S., Serjouie, A. (2015). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of oil from papaya seed by response surface methodology: Oil recovery, radical scavenging antioxidant activity, and oxidation stability. *Food Chemistry*, 172, 7-17.
- Senrayan, J., Venkatachalam, S. (2020). Ultrasonic acoustic-cavitation as a novel and emerging energy efficient technique for oil extraction from kapok seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 62, 102347.
- Sousa, G., Trifunovska, M., Antunes, M., Miranda, I., Moldão, M., Alves, V., Vidrih, R., Allen Lopes, P., Aparicio, L., Neves, M., Tecelão, C., Ferreira-Dias, S. (2021). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from *Pelvetia canaliculata* to sunflower oil. *Foods*, 10(8), 1732.
- Sydor, M., Kurasiak-Popowska, D., Stuper-Szablewska, K., Rogoziński, T. (2022). *Camelina sativa*. Status quo and future perspectives. *Industrial Crops and Products*, 187, 115531.



- Tekin, K., Akalın, M.K., Şeker, M.G. (2015). Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Industrial Crops and Products*, 77, 954-960.
- Terpiñc, P., Polak, T., Makuc, D., Ulrih, N.P., Abramovič, H. (2012). The occurrence and characterisation of phenolic compounds in *Camelina sativa* seed, cake and oil. *Food Chemistry*, 131(2), 580-589.
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., Lo, Y.M. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 202-208.
- Tontul, S.A., Mutlu, C., Koç, A., Erbaş, M. (2018). Çiya tohumundan ultrason destekli yağ ekstraksiyonunun optimizasyonu. *Gıda*, 43(3), 393-402.
- Vollmann, J., Eynck, C. (2015). Camelina as a sustainable oilseed crop: Contributions of plant breeding and genetic engineering. *Biotechnology Journal*, 10(4), 525-535.
- Wang, Z., Fang, R., Guo, H. (2020). Advances in ultrasonic production units for enhanced oil recovery in China. *Ultrasonics Sonochemistry*, 60, 104791.
- Zhong, J., Wang, Y., Yang, R., Liu, X., Yang, Q., Qin, X. (2018). The application of ultrasound and microwave to increase oil extraction from *Moringa oleifera* seeds. *Industrial Crops and Products*, 120, 1-10.

## DÜZCE'DE YETİŞTİRİLEN ANADOLU IRKI MANDA SÜTLERİNDE LAKTASYON BOYUNCA MEYDANA GELEN DEĞİŞMELER\*

Yeter Şanlı<sup>1\*\*</sup>, Hayri Coşkun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Düzce Üniversitesi, Gölyaka Meslek Yüksek Okulu, Otel, Lokanta ve İkram Hizmetleri Bölümü, Düzce, Türkiye  
<sup>2</sup>Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu, Türkiye

Geliş/Received: 19.03.2023; Kabul /Accepted: 20.05.2023; Online baskı /Published online: 03.06.2023

Şanlı, Y., Coşkun, H. (2023). Düzce'de yetiştirilen anadolu ırkı manda sütlerinde laktasyon boyunca meydana gelen değişimler. GIDA (2023) 48 (3) 641-652 doi: 10.15237/ gida.GD23034

Şanlı, Y., Coşkun, H. (2023). *Changes in the milk of anatolian buffalo raised in Düzce during lactation period. GIDA (2023) 48 (3) 641-652 doi: 10.15237/ gida.GD23034*

### ÖZ

Bu çalışmada, Anadolu mandası sütlerinin bazı fiziko-kimyasal özellikleri ve bu özelliklerde laktasyon boyunca meydana gelen değişimler incelenmiştir. Çalışma, Düzce'de yetiştirilen 30 Anadolu manda sütleri üzerinde yürütülmüş ve toplamda 462 süt örneği analiz edilmiştir. Analiz edilen manda sütü örneklerinin genel ortalama kuru madde oranı %15.74, yağ oranı %6.49, protein oranı %4.30, süt tuzları oranı %0.77, laktoz oranı %5.40, pH'sı 6.72, özgül ağırlığı 1.030, donma noktası -0.62°C, elektrik iletkenliği 2.73 mS/cm ve somatik hücre sayısı 152760 hücre/mL olarak bulunmuştur. Manda sütlerinin kuru madde değerleri laktasyonun sonlarında yüksek çıkmıştır ( $P < 0.05$ ). En yüksek yağ değeri Eylül ve Ekim aylarında gözlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Laktoz değerleri Temmuz ayında yüksek çıkmıştır. Özgül ağırlık değerleri 1.029 ile 1.033 arasında değişmiştir. İletkenlik değerleri Ağustos ayında 2.95 mS/cm'ye çıkmıştır. Donma noktası değerleri Temmuz ayına kadar düşmüş, sonraki aylarda artmıştır ( $P < 0.05$ ). Somatik hücre sayıları en yüksek Mayıs ayında tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ).

**Anahtar kelimeler:** Manda sütü, kimyasal özellikler, fiziksel özellikler, somatik hücre sayısı

## CHANGES IN THE MILK OF ANATOLIAN BUFFALO RAISED IN DUZCE DURING LACTATION PERIOD

### ABSTRACT

In this study, changes in some physico-chemical properties of Anatolian buffalo milk during lactation were investigated. The study was carried out on 30 Anatolian buffalos and 462 milk samples were analyzed. As a result, the general average dry matter value of buffalo milk samples analyzed was 15.74%, fat content 6.49%, protein 4.30%, milk salts 0.77%, lactose 5.40%, pH 6.72, specific gravity 1.030, freezing point -0.62°C, electrical conductivity 2.73 mS/cm and somatic cell count 152760 cells/mL. Dry matter values of the samples were higher at the end of lactation ( $P < 0.05$ ). The highest fat value was observed in September and October ( $P < 0.05$ ). Lactose values were high in July. Specific gravity ranged from 1.029 to 1.033. The conductivity values increased up to 2.95 mS/cm in August. Freezing point values decreased until July and increased in the following months ( $P < 0.05$ ). Somatic cell counts were highest in May ( $P < 0.05$ ).

**Keywords:** Buffalo milk, chemical properties, physical properties, somatic cell count

\* Bu makale Yeter ŞANLI'nın, "Düzce'de yetiştirilen Anadolu ırkı manda sütlerinde laktasyon boyunca meydana gelen değişimler" isimli yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır / This article was prepared from Yeter ŞANLI's master's thesis titled "Changes in the milk of Anatolian buffalo raised in Düzce during lactation period."

\*\* Sorumlu yazar /corresponding author:

✉ yetersanli@duzce.edu.tr

☎: +90(380) 711 3123/7604

Yeter Şanlı; ORCID no: 0000-0002-7087-0779

Hayri Coşkun; ORCID no: 0000-0001-9813-0046

## GİRİŞ

Diğer hayvanlarla kıyaslandığında, çoğu ülkede olduğu gibi ülkemizde de manda yetiştiriciliği olması gereken düzeyde değildir. Ülkemizde 1970-80'lı yıllarda bir milyondan daha fazla olan manda sayısı 1984 yılında 544000 başa, 2002 yılında ise 120000 başa kadar düşmüştür. Sayı 2010 yılında en düşük seviyeyi (84726 baş) görmüştür. Bu tarihten itibaren sayı tekrar artışa geçmiş ve 2017 yılında 161.439 başa ve 2022 yılında 171835 başa kadar çıkmıştır. Sayının artmasında manda yetiştiriciliğine verilen devlet desteklerin etkisi olduğu söylenebilir. Ancak ülkemizde yetiştirilen manda sayımız olması gereken düzeyde değildir. Zira sayıdaki artışa rağmen, 2016 yılından beri manda sayılarımız Ulusal Süt Konseyinin süt raporlarında bile yer almamaktadır. Bu da ülkemizdeki manda sayısının düşük olduğunun bir göstergesidir. Türkiye'de üretilen toplam süt miktarı yaklaşık 23 milyon tona çıkmış, bunun ancak %0.3'ü manda sütünden oluşmuştur (Şahin, 2015; Ergöz, 2017; USK, 2016, Anonim, 2019a; Aydın ve Güneser, 2021). Sütün içeriği açısından manda sütü inek sütüne oranla daha zengindir (Aydın ve Güneser, 2021). Manda sütü, başta yoğurt olmak üzere krema ve peynir vb. ürünler için mükemmel bir hammaddedir. Manda sütü, ürün çeşitliliği ve alternatif kaynak olması bakımlarından önem taşımaktadır.

Manda ülkemizde farklı bölgelerde camış, camız, dombey, kömüş isimleriyle anılmaktadır (Şekerden, 2001). Gerek dünyada ve gerekse ülkemizde çok sayıda manda türü bulunmaktadır. Evcil mandalar bataklık mandası ve nehir mandası olmak üzere iki alt kategoride incelenmektedir (Metry, 1996; Topaslan ve Mercan, 2018). Anadolu Mandası da bu grupta olup çoğunlukla temiz suları tercih ederler (Cockrill, 1974). Anadolu Mandası, Anadolu'da uzun yıllar yetiştiriciliği yapılan Akdeniz Mandası'nın alt ırkıdır ve Türkiye ile anılmaktadır. Türkiye'de manda yetiştiriciliği, Marmara Bölgesi'nde İstanbul; Karadeniz Bölgesi'nde Çorum, Sinop, Amasya, Samsun ve Tokat; Ege Bölgesi'nde Afyon; İç Anadolu Bölgesi'nde Yozgat ve Sivas; Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Diyarbakır; Doğu Anadolu Bölgesi'nde Muş illerimizde yaygın

olarak yapılmaktadır (Sarıözkan, 2011; Kınık ve Yerlikaya, 2015).

TÜİK (2022) verilerine göre Türkiye genelinde 171835 baş manda bulunmaktadır. Düzce'de ise, 2019 yılında yayınlanan raporlara göre toplam manda varlığı 3867 baş, manda yetiştiren işletme sayısı 225 adet ve üretilen manda sütü miktarı 1113 tondur (TÜİK, 2019; USK, 2020).

Genel olarak manda sütü bileşiminde yaklaşık %17.5 kuru madde, %8.5 yağsız kuru madde, %7.5 yağ, %5.5 protein, %4.8 laktoz, %0.8 mineral madde ve %0.22-0.40 arasında asitlik bulunmaktadır (Sezgin, 2010). Soysal vd. (2015) Anadolu mandalarının sütleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada sırasıyla laktoz, yağ ve toplam kuru madde oranlarını %5.14, %7.92 ve %18.19 olarak tespit etmişlerdir. Yılmaz vd. (2017) Bitlis Anadolu Manda sütlerinin toplam kuru madde oranını %16.18, yağ oranını %7.10, protein oranını ise %34.1 şeklinde bulmuşlardır. Tokat Anadolu Mandaları üzerine yapılan bir çalışmada manda sütlerinde yağsız kuru madde %10.88, protein %4.85, laktoz %5.17 ve yağ %5.98 olarak saptanmıştır (Şahin vd., 2016). Şekerden ve Avşar (2008) yaptıkları bir çalışmada manda sütlerinin özgül ağırlığını 1.028 ve pH değerini ise 6.61 olarak ölçmüşlerdir. Manda sütlerinde ortalama somatik hücre sayısı (SHS) ilkbaharda 10500 hücre/ml, yazın 233500 hücre/ml, sonbaharda 207000 hücre/ml ve kışın 44700 hücre/ml olarak bulunmuştur (Gürler vd., 2021).

Süt verimi ile sütteki bileşenlerin miktarı üzerine pek çok faktör etki etmektedir. Bunlar arasında hayvanın türü, yaşı, ırk ve kalıtım özellikleri, bakım, mevsimsel farklılıklar, sağım süresi ve sayısı, hastalıklar, açlık, kuraklık, heyecan, egzersiz, mastitis ve laktasyon dönemi yer almaktadır. Laktasyon dönemi süt bileşenlerini ve miktarlarını etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Laktasyonun ilk 1.5 ayına kadar süt verimi artar, ancak protein ve yağ oranında azalmalar meydana gelir. Sonraki dönemlerde yağ ve protein oranlarında artış meydana gelmektedir (Kurt, 1977).

Gürler vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada yağsız kuru madde oranının kış mevsiminde en yüksek olduğunu; yağ oranının ise en düşük ilkbahar ve yaz aylarında, en yüksek sonbahar ve kış aylarında olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca mevsim sıcaklıklarının artması, sütün yağ oranı ile ters orantılı olarak değiştiğini belirtmişlerdir. Foltys vd. (1995) manda sütünün yağ ve protein oranlarının yaz aylarında, kış aylarına oranla, daha düşük seviyede olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, mandalarda laktasyon süresi 240 gün, süt verimi 1000-1200 litre ve günlük süt verimi 5 litre olarak kaydedilmiştir. Ayrıca, araştırılan hususlarda hayvanın yaşının, bakım ve besleme koşullarının etkili olduğu belirtilmiştir (Koyuncu vd., 2021). Güven ve Soysal (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, Anadolu mandalarının laktasyon süreleri 150-355 gün arasında ve ortalama 270 gün, süt verimleri ise 1570 kg/gün olarak tespit edilmiştir.

Han vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, bir yıl boyunca her ay farklı manda (Riverine, Murra, Nili-Rivi ve Jafrabadi) kazan sütlerinden Ocak ayında alınan örneklerde kuru madde değerini %18.45, Nisan'da %16.39 ve laktasyon süresi sonunda (Aralık) %18.40 olarak bulmuşlardır. Araştırmacılar manda sütlerinin yağ değerlerini %6.57-7.97 arasında ve %7.97 ile en yüksek Kasım ayında tespit etmişlerdir. Alınan örneklerin protein oranını Ocak'ta %5.37, Nisan'da %4.65, Temmuz'da %4.70, Ekim'de %5.10 ve Aralık'ta %4.97; laktoz oranını %4.49-4.73 arasında; kül oranını Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında %0.91, diğer aylarda %0.92 şeklinde bulmuşlardır.

Salari vd. (2013) Akdeniz mandası üzerinde yaptıkları bir çalışmada; manda sütlerinde yağ miktarının laktasyonun 61. gününden itibaren sürekli artarak laktasyon sonunda en yüksek değere (%8.64) ulaştığını beyan etmişlerdir. Protein oranının laktasyonun başlangıcında ve sonunda sırasıyla %4.84 ve %4.93'e çıktığını; somatik hücre sayısının ise laktasyon periyodunun pik döneminde ve sonunda daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Yadav vd. (2013) Hindistan'da yaptıkları çalışmada, laktasyonun süt verimi, laktoz ve yağ oranları üzerine etkisinin istatistiki olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir. Yaz mevsiminde özellikle nemli ve çok sıcak aylarda sıcaklığın da etkisiyle süt veriminin %9 oranında azaldığını, kış mevsiminde ise %10.6 oranında artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Protein miktarı ve yağ oranının kış aylarında daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Doğu Azerbaycan'da yapılan bir çalışmada süt verimi, laktasyon ve malaklama mevsiminin sütün bileşimine etkisinin önemli olduğu; malaklama mevsiminin yağ oranına etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Khosroshahi vd., 2011).

Şekerden ve Avşar (2008) Anadolu Mandaları üzerine yaptıkları bir çalışmada; toplam kuru madde ve protein oranının incelenen çevresel unsurlardan etkilenmediğini; Şekerden (1999) ise yağ ve yağsız kuru madde miktarlarının doğum mevsiminden ve laktasyon döneminden etkilendiğini tespit etmiştir. Şekerden ve Küçükkepapçı (1999) yağ ve toplam kuru madde oranının laktasyon döneminden istatistiksel olarak etkilendiğini tespit etmişlerdir.

Düzce'de yetiştiriciliği yapılan Anadolu manda sütleri ve özellikleri üzerine herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, Düzce'de 'Mandacı İlyas Çiftliği'nde yetiştirilen Anadolu mandalarının sütlerinin genel bazı fizikokimyasal özellikleri ve bu özelliklerde laktasyon süresi boyunca meydana gelen değişmelerin ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar manda yetiştiriciliği ve manda sütünün değerlendirilmesi bakımından önemlidir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada materyalini, Düzce'de faaliyet gösteren 'Mandacı İlyas Çiftliği'nde yetiştirilen Anadolu mandalarının sütleri oluşturmuştur. Laktasyon boyunca çiftlikteki toplam 30 mandadan 462 süt örneği alınmış ve analizleri yapılmıştır. Süt örnekleri Nisan 2020 tarihinde alınmaya başlanmış ve 27 hafta devam etmiştir. Analizlerin yapıldığı bahar aylarında ortalama hava sıcaklığı 20 °C ve havanın nemi ortalama 68 g/m<sup>3</sup>, yaz aylarında ortalama sıcaklık 28 °C ve havanın nemi

60 g/m<sup>3</sup>, sonbahar aylarında sıcaklık ortalama 23 °C ve havanın nemi 65 g/m<sup>3</sup> olarak ölçülmüştür. Çalışmanın yapıldığı dönemde çiftlikte kapalı alan yetiştiriciliği yapıldığından mandalar meraya çıkmamaktaydı. Hayvanlar saman ve silaj ile yemlenmekteydiler. Ayrıca hayvanlara süt yemi ile de takviye yapılmaktaydı. Bu yemin içeriğinde ağırlıklı olarak buğday ve çeşitli baklagil tohumları bulunmaktaydı.

Alınan süt örneklerinde bazı kimyasal (kuru madde, yağsız kuru madde, yağ, protein, tuz bileşenleri ve laktoz) ve fiziksel analizler (pH, özgül ağırlık, donma noktası ve iletkenlik) Lactoscan Milk Analyser (Milkotronik Ltd., 4, Narodni Buditeli Str. 8900 Nova Zagora, Bulgarıya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizler için cihazın düğmesi açılarak bir müddet beklenmiştir. Analiz modu manda sütüne ayarlanan cihazın ilk kullanımında pH kalibrasyonu yapılmıştır. Daha sonra cihazın örnek kabına manda sütü örneği konarak sonuçlar okunmuştur. Her örnek için 3 paralel ölçüm yapılmıştır (Anonim, 2019b).

Somatik hücre sayımında (SHS) (hücre/mL) 'Milkana® Somatic Scan' (MAYASAN® biotech, Ömerli Cad. No:18 Hadımköy, İstanbul 34555)

cihazı kullanılmıştır. SHS sayımı için 3.5 g milkoprim tartıldı ve bir erlene konuldu. Üzerine sıcaklığı 30-35 °C olan distile sudan 100 mL su ilave edildi, iyice karıştırıldı ve 20-22 °C'ye soğutuldu. Raf ömrü 5 gün olan bu çözelti kullanım boyunca 4-8 °C'de muhafaza edilmiştir. Süt örneklerinin sıcaklığı 20-22 °C arasında olmasına dikkat edilmiştir. Süt bir süzme bezi yardımıyla süzildikten sonra 15-20 defa çalkalanmış ve kullanım kılavuzunda belirtilen işlemler takip edilerek somatik hücre sayısı tespit edilmiştir (Anonim, 2022).

Veri ortalamaları arasında fark olup olmadığını kontrol etmek için ANOVA testi, farklılığın hangi aylar arasında olduğunu tespit etmek amacıyla da Waller-Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (Devore ve Peck, 1993). İstatistiksel analizler SPSS 21.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### Manda sütü örneklerinin genel bazı fiziko-kimyasal özellikleri

Toplam 462 manda sütü örneğine ait bazı fiziko-kimyasal özellikler Çizelge 1'de bir araya getirilmiştir.

Çizelge 1. Analiz edilen manda sütü örneklerinin genel bazı fiziko-kimyasal özellikleri

Table 1. Some general physico-chemical properties of the analyzed buffalo milk samples

| Özellikler/ Properties                  | n   | En düşük/<br>Minimum | En yüksek/<br>Maximum | Ortalama ± SD<br>Mean ± SD |
|---|-----|----------------------|-----------------------|----------------------------|
| Kuru madde/<br>Dry matter (%)           | 462 | 10.97                | 24.13                 | 15.74±0.702                |
| Yağsız kuru madde/<br>Non fat solid (%) | 462 | 3.21                 | 12.26                 | 9.25±0.971                 |
| Yağ/ Fat (%)                            | 462 | 1.44                 | 20.92                 | 6.49±2.114                 |
| Protein/ Protein (%)                    | 462 | 1.21                 | 4.49                  | 3.38±0.368                 |
| Süt tuzları/ Milk salts (%)             | 462 | 0.28                 | 0.99                  | 0.77±0.074                 |
| Laktoz/ Lactose (%)                     | 462 | 1.81                 | 6.95                  | 5.14±0.510                 |
| pH                                      | 462 | 6.00                 | 7.16                  | 6.72±0.184                 |
| Özgül ağırlık/<br>Specific gravity      | 462 | 1.009                | 1.040                 | 1.030±0.005                |
| Donma noktası/<br>Freezing point (°C)   | 462 | -0.82                | -0.25                 | -0.62±0.062                |
| İletkenlik/<br>Conductivity (mS/cm)     | 462 | 1.19                 | 6.19                  | 2.73±0.599                 |
| SHS/ SCC (x1000 hücre/mL)               | 462 | 90                   | 1500                  | 152.76±141.098             |

n: Analiz edilen toplam örnek sayısı/ Total number of samples analyzed, SD: Standart sapma/ Standard deviation, SHS/ SCC: Somatik hücre sayısı/ Somatic cell count

Elde edilen sonuçlara göre analiz edilen örneklerde kuru madde değerleri en düşük %10.97, en yüksek %24.13 olarak (ortalama değer %15.74) bulunmuştur (Çizelge 1). Genel olarak manda sütlerinde kuru madde oranları %17.5 civarındadır (Sezgin, 2010). Manda sütü içeriği, yaşadığı bölge, melez tipi, yetiştirme şartları, besleme ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Kınık ve Yerlikaya, 2015).

Analiz edilen manda sütü örneklerinin yağsız kuru madde oranları en düşük %3.21, en yüksek %12.26 ve ortalama %9.25 şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 1). Gürler vd. (2013) yaptıkları bir çalışmada, yağsız kuru madde oranını %8.56 olarak bulmuşlardır. Elde edilen ortalama değer araştırmacının elde ettiği ortalama değerden yüksektir.

Manda sütü örneklerinde yağ oranları %1.44 ile 20.92 arasında değişim göstermiş ve ortalama %6.49 değerini almıştır (Çizelge 1). Elde edilen ortalama değer, Sezgin (2010)'nin manda sütü için belirledikleri ortalama yağ (%7.5) değerinden düşüktür.

Manda sütü örneklerinin protein değerleri en az %1.21, en fazla %4.49 ve ortalama %3.38 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1). Genel olarak manda sütlerinde protein oranı ortalama %4.30 şeklindedir (Sezgin, 2010). Şahin vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada protein oranını %4.95 olarak rapor etmişlerdir.

Analiz edilen 462 manda sütü örneklerinde tespit edilen süt tuzlarına ait değerler %0.28-0.99 arasında değişmiş ve ortalama %0.77 olmuştur (Çizelge 1). Süt tuzları, sütteki toplam mineral madde miktarına denk gelmese de (Jennes, 1988), kıyaslama yapmak bakımından Yılmaz vd. (2017)'nin Anadolu ırkı manda sütü örneklerinde bulunduğu mineral madde miktarından (%0.67) yüksektir.

Manda sütü örneklerinde laktoz değerleri %1.81-6.95 arasında değişmiş ve ortalama %5.4 olarak bulunmuştur (Çizelge 1). Gürler vd. (2021) laktoz değerini yaz sütlerinde %1.08-4.98 arasında, kış sütlerinde %1.20-5.53 arasında tespit etmişlerdir. Tespit edilen en düşük laktoz değeri sadece bir

örneğe aittir ve bu örnekte somatik hücre sayısı (SHS) 1500000 hücre/mL'dir. Alessio vd. (2021) sütte SHS arttıkça laktoz oranının düştüğünü, bu ikisi arasında negatif bir ilişkinin bulunduğunu ve bunun mastitis hastalığının bir belirtisi olarak değerlendirilmesi gerektiğini, netice olarak da laktoz sentezinin azaldığını ifade etmektedir.

Manda sütü örneklerinin pH değerleri en düşük 6.00 ve en yüksek 7.16 olarak kaydedilmiştir. Ortalama olarak da 6.72 şeklinde tespit edilmiştir (Çizelge 1). Yılmaz vd. (2017) Anadolu manda sütleri üzerinde yürüttükleri bir çalışmada sütlerin pH değerini 6.68 olarak rapor etmişlerdir. Şekerden ve Avşar (2008), mastitis ve laktasyon döneminin pH üzerinde önemli etkileri olduğunu ifade etmişlerdir.

Manda sütü örneklerine ait özgül ağırlık değerleri 1.009-1.040 arasında değişmiş ve ortalama 1.030 değerini almıştır (Çizelge 1). Normal şartlarda manda sütlerinin özgül ağırlığı, inek sütünün özgül ağırlığından yüksektir (Kınık ve Yerlikaya, 2015). Sütün özgül ağırlığı içerisinde bulunan su, yağ, protein, şeker ve mineral madde miktarına bağlı olarak değişmektedir (Kurt vd., 1996). Elde edilen ortalama değer Adam (1975)'in bildirdiği ortalama değerlerden düşüktür.

Analiz edilen örneklerde donma noktası -0.82 °C ile -0.25 °C arasında değişmiş ve ortalama -0.62 °C değerini almıştır (Çizelge 1). Manda sütlerinin genel olarak donma noktası mevsim ve yetiştirme yöntemlerine bağlı olarak -0.518 ile -0.590 °C arasında değişmektedir. Manda sütlerinin donma noktasının mevsimlerden ve yetiştirme yöntemlerinden etkilendiği belirtilmiştir (Kınık ve Yerlikaya, 2015).

Manda sütü örneklerine ait elektrik iletkenliği en düşük 1.19 mS/cm, en yüksek 6.19 mS/cm ve ortalama 2.73 mS/cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 1). Sütün elektrik iletkenliği, Na ve Cl içeriğine bağlı olarak değişmekte ve bu miktarlardaki artış iletkenliği de artırmaktadır (Gürsoy, 2007). İnek ırklarındaki farklılığın sütün iyon içeriğine etki ettiği ve bunun da elektrik iletkenliğine yansıdığı ifade edilmekte ve iletkenlik değerlerinin sağlıklı ineklerde 4.5-5.6 mS/cm arasında değiştiği belirtilmektedir (Hamann ve Zeconi, 1998).

Sütte bulunan ve önemli kalite parametrelerinden biri olan somatik hücre sayısı manda sütü örneklerinde en düşük 90000 hücre/mL, en yüksek 1500000 hücre/mL ve ortalama 152760 hücre/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 1). En yüksek somatik hücre sayısına Mayıs ve Haziran aylarında rastlanmıştır. Somatik hücre sayısının yükselmesine meme bezi enfeksiyonu, buzağılama sırası, laktasyon dönemi, stres, mevsim gibi faktörler etki etmektedir (Rodriguez-Zas vd., 2000).

### Laktasyon boyunca manda sütlerinde meydana gelen kimyasal değişimler

Laktasyon süresi boyunca manda sütlerinin kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimler Çizelge 2'de sunulmuştur. Çizelge 2'den görüleceği üzere manda sütü örneklerinin kuru madde değerleri laktasyonun ilk iki ayında %15.5 civarında seyretmiş, üçüncü aydan itibaren %16'nın üzerine çıkmış ve son ayda ise düşüş eğilimine girmiştir. Kuru madde değeri Temmuz ayında en üst noktaya (%16.28) ulaşmıştır.

Çizelge 2. Laktasyon boyunca manda sütlerinin kimyasal özelliklerinde meydana gelen değişimler  
Table 2. Changes in chemical properties of buffalo milk during lactation

| Özellikler/<br>Properties (%)    | Aylar/ Months                  |                               |                              |                              |                              |                              |                               | Genel<br>ortalama/<br>General<br>mean<br>(n=462) |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|
|                                  | Nisan/<br>April<br>(n=60)      | Mayıs/<br>May<br>(n=116)      | Haziran/<br>June<br>(n=108)  | Temmuz/<br>July<br>(n=75)    | Ağustos/<br>August<br>(n=58) | Eylül/<br>Sept.<br>(n=32)    | Ekim/<br>October<br>(n=13)    |  |
| Kuru Madde/ Dry Matter           | 15.51<br>±1.379 <sup>ab*</sup> | 15.52<br>±1.860 <sup>ab</sup> | 15.33<br>±1.967 <sup>b</sup> | 16.28<br>±1.390 <sup>a</sup> | 16.18<br>±1.282 <sup>a</sup> | 16.21<br>±1.634 <sup>a</sup> | 15.90<br>±1.524 <sup>ab</sup> | 15.74<br>±1.704                                  |
| Yağ/ Fat                         | 6.71<br>±1.887 <sup>ab</sup>   | 6.59<br>±2.463 <sup>ab</sup>  | 5.78<br>±2.466 <sup>b</sup>  | 6.51<br>±1.421 <sup>ab</sup> | 6.87<br>±1.617 <sup>a</sup>  | 7.20<br>±1.751 <sup>a</sup>  | 7.08<br>±1.440 <sup>a</sup>   | 6.49<br>±2.116                                   |
| Yağsız Kuru Madde/ Non fat solid | 8.80<br>±1.011 <sup>a</sup>    | 8.94<br>±0.937 <sup>ab</sup>  | 9.55<br>±1.071 <sup>cd</sup> | 9.78<br>±0.827 <sup>d</sup>  | 9.31<br>±0.648 <sup>bc</sup> | 9.01<br>±0.699 <sup>ab</sup> | 8.82<br>±0.514 <sup>a</sup>   | 9.25<br>±0.972                                   |
| Protein                          | 3.23<br>±0.402 <sup>c</sup>    | 3.25<br>±0.356 <sup>c</sup>   | 3.48<br>±0.398 <sup>a</sup>  | 3.57<br>±0.297 <sup>a</sup>  | 3.42<br>±0.254 <sup>ab</sup> | 3.28<br>±0.303 <sup>bc</sup> | 3.23<br>±0.225 <sup>c</sup>   | 3.38<br>±0.368                                   |
| Laktoz/ Lactose                  | 4.86<br>±0.507 <sup>d</sup>    | 4.93<br>±0.482 <sup>cd</sup>  | 5.24<br>±0.580 <sup>ab</sup> | 5.43<br>±0.428 <sup>a</sup>  | 5.32<br>±0.297 <sup>ab</sup> | 5.13<br>±0.337 <sup>c</sup>  | 4.99<br>±0.282 <sup>cd</sup>  | 5.14<br>±0.510                                   |
| Süt tuzları/ Milk salts          | 0.73<br>±0.082 <sup>c</sup>    | 0.74<br>±0.074 <sup>c</sup>   | 0.79<br>±0.086 <sup>ab</sup> | 0.81<br>±0.050 <sup>a</sup>  | 0.79<br>±0.042 <sup>ab</sup> | 0.76<br>±0.055 <sup>bc</sup> | 0.76<br>±0.045 <sup>bc</sup>  | 0.77<br>±0.074                                   |
| pH                               | 6.63<br>±0.241 <sup>b</sup>    | 6.70<br>±0.173 <sup>ab</sup>  | 6.75<br>±0.175 <sup>a</sup>  | 6.74<br>±0.166 <sup>a</sup>  | 6.79<br>±0.160 <sup>a</sup>  | 6.73<br>±0.164 <sup>a</sup>  | 6.76<br>±0.108 <sup>a</sup>   | 6.72<br>±0.184                                   |

n: Analiz edilen manda sütü örnek sayısı, SD: Standart sapma, \*: Farklı harfler taşıyan ortalamalar birbirinden farklı ( $P < 0.05$ ), aynı harf taşıyanlar farksızdır ( $P > 0.05$ ).

n: Number of samples of buffalo milk analyzed, SD: Standard deviation, \*: Means with different letters are different from each other ( $P < 0.05$ ), those with the same letter are not different ( $P > 0.05$ ).

Genel olarak bakıldığında kuru madde değerleri laktasyonun ilk aylarında düşük ve sonlarına doğru yüksek bulunmuştur. Aylar itibarıyla kuru madde değerleri arasındaki fark önemli ( $P < 0.05$ ) bulunmuştur. Haziran ayı ile Temmuz, Ağustos ve Eylül ayları arasında farklılığın önemli ( $P < 0.05$ ), diğer aylar arasında farkın önemsiz ( $P > 0.05$ ) olduğu tespit edilmiştir. Han vd. (2012)'nin yapmış olduğu bir çalışmada toplam kuru madde değerlerini %16.39-18.48 arasında bulmuşlardır.

Hashmi ve Saleem (2015) ise ortalama toplam kuru madde değerini %16.38 olarak rapor etmiştir. Kuru madde değerlerinin ilkbahar ve kış aylarında birbirine benzediği, sonbahar ve yaz aylarında farklı olduğu saptanmıştır (Gürler vd., 2021). Sütlerin toplam kuru madde oranlarına laktasyon dönemi ve mevsim gibi faktörler doğrudan etki etmektedir (Şekerden ve Küçükkepapçı, 1999; Şekerden ve Avşar, 2008).

Laktasyon boyunca alınan manda sütü örneklerinde yağ oranları ilk ayda %6.71 iken, üçüncü aya kadar bu oran %5.78'e düşmüştür. Üçüncü aydan sonra yağ değerleri laktasyonun sonuna kadar yükselmiştir. Diğer yandan en düşük yağ değeri Haziran ayında gözlenirken, en yüksek yağ değeri Eylül ve Ekim aylarında gözlenmiştir. Haziran ayı (en düşük yağ değeri) ile Ağustos, Eylül ve Ekim ayları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ( $P < 0.05$ ); Haziran ile Nisan, Mayıs ve Temmuz ayları arasında fark önemsiz ( $P > 0.05$ ) bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen değerler Han vd. (2012) tarafından ortaya konan değerlerden düşük çıkmıştır. Foltys vd. (1995) yağ içeriklerinin kış aylarına oranla yaz aylarında daha düşük çıktığını ifade etmişlerdir. Hayvanların beslenme durumları yağ ve protein oranları üzerinde etkili bir faktördür. Yemlemenin yağ değeri üzerinde %3'lük bir birim değişim etkisine sahip olduğu ifade edilmektedir. Süt yağının yemlemeye karşı çok hassas bir değişim göstermesi yanında, sütün bileşimi üzerine genetik faktörler, çevre, süt üretim düzeyi, laktasyon evresi, mastitis, mevsim ve hayvanın yaşı da etki etmektedir (Waldner vd., 2003).

Manda sütü örneklerinde yağsız kuru madde değeri Nisan ayında ortalama %8.80 ile başlamış, bu aydan itibaren artarak Temmuz ayında %9.77'ye ulaşmış, ancak Ekim ayında %8.82'ye kadar gerilemiştir (Çizelge 2). Haziran ve Temmuz ayına ait yağsız kurumadde oranları benzer ( $P < 0.05$ ), Haziran ve Temmuz ile diğer aylar arasındaki fark önemli ( $P < 0.05$ ) bulunmuştur. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY)'ne göre manda sütlerinde yağsız kuru madde miktarı en az %8.50 olmalıdır. Çalışmamızdan elde edilen en düşük değer TGKY'nde öngörülen en az değerden yüksektir.

Manda sütlerinde protein değerleri Nisan ayından itibaren Temmuz ayına kadar yükselmiş, ondan sonraki aylarda düşüşe geçmiştir (Çizelge 2). Haziran, Temmuz ve Ağustos ayları arasında protein değerlerindeki fark önemsiz ( $P > 0.05$ ); bu aylar ile diğer aylar arasındaki fark ise önemli ( $P < 0.05$ ) bulunmuştur. Gürler vd. (2021) Anadolu manda sütleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada Bahar ve Yaz aylarında protein oranını düşük,

Sonbahar ve Kış aylarında daha yüksek bulmuşlardır. Nili-Ravi ırkında yapılan bir çalışmada protein oranı %3.30 olarak tespit edilmiştir (Javed vd.,2013). Yılmaz vd. (2017) Anadolu mandası sütlerinde protein oranını %3.40 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Javed vd. (2013) ile Yılmaz vd. (2017)'nin elde ettikleri sonuçlara benzerlik göstermektedir.

Laktoz değerleri Nisan ayından Temmuz ayına kadar artış, Temmuz ayından Ekim ayına kadar düşüş göstermiştir. Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarına ait laktoz değerleri arasında fark önemsiz ( $P > 0.05$ ); bu aylar ile diğer aylar arasındaki fark ise önemli ( $P < 0.05$ ) bulunmuştur. Soysal vd. (2015) Anadolu mandası sütlerinin laktoz oranını %5.14 olarak bildirmişlerdir. Cerón-Muñoz vd. (2002) somatik hücre sayısının artmasıyla laktoz oranının azaldığını, Yadav vd. (2013) laktasyonun laktoz içeriğine etkili olduğunu ifade etmişlerdir.

Manda sütü örneklerinin tuz oranları Nisan ayından itibaren Temmuz ayına kadar hızlıca artmış, Temmuz ayından sonra ise düşüşe geçmiştir (Çizelge 2). En yüksek tuz bileşenlerinin elde edildiği Haziran, Temmuz ve Ağustos ayları arasında fark önemsiz ( $P > 0.05$ ), bu üç aya ait değerler ile Nisan ve Mayıs aylarına ait değerler arasında fark önemlidir ( $P < 0.05$ ). Süt tuzları molekül ağırlığı 300 veya daha az iyonize veya iyonize olabilir maddeler olarak dikkate alınmaktadır. Süt tuzları organik ve inorganik maddeleri içine alır. Böylece süt tuzları denince sütteki mineral maddelere veya küle denk gelmezler. Başlıca katyonlar olarak Na, K, Ca ve Mg; anyonik bileşenler olarak da fosfatlar, sitratlar, klorür, karbonat ve sülfatlar sayılabilir (Jennes, 1988). Mastitis durumlarında meme kan kılcal damarlarında geçirgenlik artar. Somatik hücre sayısı yüksek sütlerde P ve K içeriği düşük, Na ve Cl içeriği yüksektir. Böylece somatik hücrelerdeki artış, kazeindeki mineral oranlarında bir değişikliğe neden olmamaktadır (Summer vd., 2009).

İncelenen örneklerin pH değerleri örneklerin ilk alındığı Nisan ayı ile, Mayıs ayı hariç, diğer aylara ait pH değerlerinden farklı ( $P < 0.05$ )



bulunmuştur. Anadolu mandaları üzerinde yapılan bir araştırmada en yüksek pH değerinin laktasyonun başlarında, en düşük ise laktasyonun sonlarında elde edildiği kaydedilmiştir (Şekerden ve Avşar, 2008).

### Laktasyon boyunca manda sütlerinin fiziksel özelliklerinde ve somatik hücre sayısında meydana gelen değişimler

Laktasyon boyunca manda sütlerinin bazı fiziksel özelliklerinde ve somatik hücre sayısında (SHS) meydana gelen değişimler Çizelge 3'de bir araya getirilmiştir.

Çizelge 3. Laktasyon boyunca manda sütlerinin fiziksel özelliklerinde ve somatik hücre sayısında meydana gelen değişimler

Table 3. Changes in physical properties and somatic cell count of buffalo milk during lactation

| Özellikler/ Properties             | Aylar/ Months                 |                                |                                 |                                |                                |                                |                                | Genel ortalama/ General mean (n=462) |
|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
|                                    | Nisan/ April (n=60)           | Mayıs/ May (n=116)             | Haziran/ June (n=108)           | Temmuz / July (n=75)           | Ağustos/ August (n=58)         | Eylül/ Sept. (n=32)            | Ekim/ October (n=13)           |                                      |
| Özgül Ağırlık/ Specific gravity    | 1.029<br>±0.04 <sup>b</sup>   | 1.029<br>±0.05 <sup>b</sup>    | 1.032<br>±0.04 <sup>a</sup>     | 1.033<br>±0.03 <sup>a</sup>    | 1.032<br>±0.03 <sup>a</sup>    | 1.030<br>±0.03 <sup>b</sup>    | 1.030<br>±0.03 <sup>b</sup>    | 1.031<br>±0.04                       |
| İletkenlik/ Conductivity (mS/cm)   | 2.40<br>±0.68 <sup>c</sup>    | 2.55<br>±0.76 <sup>bc</sup>    | 2.89<br>±0.57 <sup>a</sup>      | 2.84<br>±0.36 <sup>a</sup>     | 2.95<br>±0.31 <sup>a</sup>     | 2.87<br>±0.39 <sup>a</sup>     | 2.72<br>±0.21 <sup>ab</sup>    | 2.73<br>±0.60                        |
| Donma noktası/ Freezing point (°C) | -0.59<br>±0.060 <sup>a</sup>  | -0.60<br>±0.063 <sup>ab</sup>  | -0.63<br>±0.070 <sup>bc</sup>   | -0.66<br>±0.055 <sup>d</sup>   | -0.64<br>±0.037 <sup>cd</sup>  | -0.61<br>±0.039 <sup>abc</sup> | -0.61<br>±0.035 <sup>abc</sup> | -0.62<br>±0.063                      |
| SHS/ SCC (×1000)                   | 152.37<br>±63.6 <sup>ab</sup> | 191.34<br>±217.29 <sup>a</sup> | 144.35<br>±166.90 <sup>ab</sup> | 130.39<br>±31.16 <sup>ab</sup> | 143.98<br>±56.72 <sup>ab</sup> | 123.78<br>±28.82 <sup>ab</sup> | 119.77<br>±20.10 <sup>b</sup>  | 152.76<br>±141.25                    |

n: Analiz edilen manda sütü örnek sayısı, SD: Standart sapma, \*: Farklı harfler taşıyan ortalamalar birbirinden farklı ( $P < 0.05$ ), aynı harf taşıyanlar farksızdır ( $P > 0.05$ ), SHS: Somatik hücre sayısı.

n: Number of samples of buffalo milk analyzed, SD: Standard deviation, \*: Means with different letters are different from each other ( $P < 0.05$ ), those with the same letter are not different ( $P > 0.05$ ), SCC: Somatic cell count

Manda sütü örneklerinin özgül ağırlık değerleri Nisan ayından Temmuz ayına kadar artmış, Temmuz ayından Ekim ayına kadar düşüş eğilimi göstermiştir (Çizelge 3). Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarına ait özgül ağırlık değerleri diğer aylardan farklı ( $P < 0.05$ ) bulunmuştur. Şekerden ve Avşar (2008) laktasyonun başında özgül ağırlığın en düşük değerinde, laktasyonun sonuna doğru en yüksek değerinde olduğunu bildirmişlerdir. Şahin vd. (2016) örnekleme zamanının, doğum sayısının, besleme koşullarının, laktasyon durumunun ve doğurma yaşının; manda sütünün yoğunluk, donma noktası, kuru madde, yağsız kuru madde, yağ, protein, laktoz ve kazein içeriğine önemli etkisi olduğunu vurgulamışlardır.

Elektrik iletkenlik değerleri süt örneklerinde Nisan ayında 2.40 mS/cm, Ağustos ayında 2.95 mS/cm ve laktasyon sonunda 2.72 mS/cm olmuştur (Çizelge 3). Nisan ayında elde edilen değer, diğer aylardan farklı çıkmıştır ( $P < 0.05$ ).

Hamann ve Zecconi (1998) iletkenlik değerinin laktasyon boyunca artabileceğini veya azalabileceğini; iletkenlik değerinin  $< 5.50$  mS/cm olması durumunda mandaların mastitis yönünden sağlıklı olabileceğini beyan etmişlerdir.

Manda sütü örneklerinin donma noktası değerleri en yüksek Nisan ayında ve en düşük Temmuz ayında kaydedilmiş (Çizelge 3) ve bu değerler Nisan ayından Temmuz ayına kadar düşüş göstermiş, sonraki aylarda artmıştır. Temmuz ayına ait donma noktası değerleri ile diğer aylara ait donma noktası değerleri arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ). Elde edilen değerler Şahin ve Ulutaş (2014) tarafından kaydedilen değerlerden daha düşüktür. Çiğ sütün donma noktası laktoz ve süt tuzlarının konsantrasyonuna göre değişiklik gösterir (Metin, 2005).

Meme sağlığı hakkında önemli bilgi veren somatik hücre sayıları normal düzeydedir denebilir

(ortalama 152760 hücre/mL), zira ilgili mevzuatta  $\leq 500.000$  hücre şeklindedir. Ekim ayında elde edilen en düşük sayı (119770 hücre/mL) ile Mayıs ayında elde edilen en yüksek sayı (191340 hücre/mL) arasındaki fark önemlidir ( $P < 0.05$ ). Şahin vd. (2012) Anadolu mandası süt örneklerinde somatik hücre sayısını 166056 hücre/ml olarak tespit etmişlerdir. Tokat'ın Erbaa, Turhal, Pazar, Niksar ve Almus ilçelerinde bulunan 112 işletmeden 250 baş Anadolu mandasından alınan süt örneklerinde yapılan analizler sonucunda, somatik hücre sayısı 166100 hücre/mL olarak tespit edilmiştir (Şahin vd., 2012). Araştırmacıların elde etmiş olduğu bu değer, çalışmamızdan elde edilen ortalama değerden yüksektir. Laktasyon sayısı, laktasyon evresi, kızgınlık ve hafif egzersiz gibi fizyolojik veya çevresel faktörlerin, enfekte olmamış (bakteriyolojik olarak negatif) meme bölümlerinden gelen somatik hücre sayısı üzerinde marjinal etkileri olduğu ifade edilmiştir (Brahma vd., 2017).

### SONUÇ

Bu çalışmada; Düzce'de faaliyet gösteren 'Mandacı İlyas Çiftliği'nde yetiştirilen Anadolu mandalarının sütlerinin bazı özellikleri ve bu özelliklerde laktasyon boyunca meydana gelen değişimler incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; manda sütlerinde ortalama kuru madde %15.74, yağ %6.49, protein %3.38, süt tuzları %0.77, laktoz %5.14, pH 6.72, özgül ağırlık 1.030, donma noktası  $-0.62$  °C, iletkenlik 2.73 mS/cm ve somatik hücre sayısı 152760 hücre/mL şeklinde bulunmuştur. Ayrıca, kuru madde değerleri laktasyonun ilk aylarında düşük ve sonlarına doğru yüksek bulunmuştur. Laktasyon boyunca en düşük yağ değeri Haziran ayında, en yüksek yağ değeri Eylül ve Ekim aylarında gözlenmiştir. Yağsız kuru madde değeri Temmuz ayına kadar artmış, ancak Ekim ayında düşmüştür. Protein değeri Nisan ayından itibaren Temmuz ayına kadar yükselmiş, ondan sonraki aylarda düşüşe geçmiştir. Laktoz değerleri Nisan ayından Temmuz ayına kadar artmış, sonra düşüş şeklinde gerçekleşmiştir. Tuz bileşenleri Temmuz ayına kadar hızlıca artış göstermiş, Temmuz ayından sonra ise düşmüştür. Manda sütü örneklerinde pH değerleri Haziran ayından sonra dalgalanma

göstermiştir. Özgül ağırlık değerleri Nisan ayından Temmuz ayına kadar artmış, daha sonra düşmüştür. İletkenlik değerleri Ağustos ayına kadar artmış, sonra azalmıştır. Donma noktası değerleri Temmuz ayına kadar düşüş göstermiş, sonraki aylarda artmıştır. Somatik hücre sayıları Mayıs ayına kadar artmış, bilehane düşüş eğilimine girmiştir. Sonuçlar manda yetiştiricileri ve manda sütü işleyen işletmeler için önemli bilgiler içermektedir. Ülkemizde geçmişe kıyasla sayıları azalmış bulunan ve alternatif bir süt kaynağı olan manda, manda yetiştiriciliği ve manda sütleri üzerine ileri araştırmalar yapmaya ihtiyaç vardır.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makalede, diğer kişiler ve kurumlar arasında herhangi bir çıkar çatışmasının olmadığını beyan eder.

### YAZAR KATKILARI

Yeter Şanlı örneklerin toplanması, analizlerin yapılması ve yazımında; Hayri Coşkun çalışmanın yönetilmesi, verilerin yorumlanması ve makalenin yazımında katkıları olmuştur.

### TEŞEKKÜR

Örnek almada, analizler için gerekli cihazların kullandırılmasında ve çalışmaya verdiği diğer tüm desteklerden dolayı "Mandacı İlyas Çiftliği"ne teşekkür ederiz.

### KAYNAKLAR

Adam, R.C. (1975). Manda Sütü. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no:188. Bornova/İzmir.

Alessio, D. R. M., Velho, J. P., McManus, C. M., Knob, D. A., Vancin, F. R., Antunes, G. V., Busanello, M., De Carli, F., Neto, A. T. (2021). Lactose and its relationship with other milk constituents. somatic cell count. and total, bacterial count. *Livestock Science* 252(104678): 1-7.

Anonim, (2019a). <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/yayin/Katalog%20T%C3%BCrk%C3%A7e.pdf>. Erişim Tarihi: 01.10.2019.

Anonim, (2019b). Operation manual. Lactoscan S Milk Analyser. Milkotronic Ltd.. Narodni Buditeli Str.. 8900 Nova Zagora. Bulgaria.

- Anonim, (2022). Milkana Somatic Scan. Somatik Hücre Süt Analiz Cihazı kullanım kılavuzu. Mayasan® biotech. Ömerli Cad. No:18 Hadımköy / İstanbul 34555.
- Aydın B., Güneşer, O. (2021). Manda sütünden üretilen bazı ürünlerin duyuşal özellikleri. *Uşak Üniversitesi Fen ve Doğa Bilimleri Dergisi* 110-123 2021 (1).
- Brahma, B., Ghosh, C.P., Kesh, S.S., Roy, D., and Tudu, N.K. (2017). Somatic cell counts (scc) in milk - its impact and significance: A review. *Trends in Biosciences* 10 (2): 474-480.
- Cerón-Muñoz, M., Tonhati, H., Duarte, J., Oliveira, J., Munoz-Berrocal, M., Jurado-Gomez, H. (2002). Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. *Journal of Dairy Science* 85: 2885-2889.
- Cockrill, R.W. (1974). The Husbandry and health of domestic buffalo. FAO. Rome. Italy.
- Devore, J., Peck, R. (1993). Statistics: The exploration and analysis of data. Duxbury Press. An imprint of Wadsworth Publishing Company. Belmont /California/USA.
- Ergöz. E. (2017). Manda sütünden üretilen yayık ve krema tereyağlarının nitelikleri. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Ankara.
- Foltys, V., Pazmova, J., Chobotova, E., Zatopkova, V. (1995). Influence of season on composition of bulk milk in relation to its technological processing. EAAP 46th Meeting European Association for Animal Production. Prague, 210s.
- Gürler, Z., Karadaş, E., Kozan, E., Çelik, H. A., Birdane, F. M., Kara, R., Acaröz, U. (2021). Investigation of effect of somatic cell count and seasons on buffalo milk quality. *Kocatepe Veterinary Journal* 14 (2): 268-273.
- Gürler, Z., Kuyucuoğlu, Y., Pamuk, Ş. (2013). Chemical and microbiological quality of Anatolian Buffalo milk. *African Journal of Microbiology Research* 7 (16): 1512-1517.
- Gürsoy. A. (2007). Sütün nitelikleri. Süt teknolojisi (Ed. Atilla Yetişemiyen). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No: 513. ss27-55.
- Güven, H., Soysal, İ. (2014). İstanbul yöresinde yetiştirilen Anadolu mandalarının laktasyon dönemi boyunca süt verim ve bileşimlerinin değişimi üzerine bir çalışma. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ.
- Hamann, J., Zeconi, A. (1998). Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *Bulletin of the IDF* no: 334: 5-20.
- Han, X., Lee, F. L., Zhang, L., Guo, M. R. (2012). Chemical composition of water buffalo milk and its low-fat symbiotic yogurt development. *Functional Foods in Health and Disease* 2 (4): 86-106.
- Hashmi, S., Saleem. Q. (2015). An investigation on microbiological and chemical quality of buffalo milk supplies. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4(1): 78-83.
- Javed, K., Abdullah, M., Khalid, M. S., Ahmad, N., Bhatti J. A., Younas, U. (2013). Inter-relationship of milk constituents with body and udder measurements in Nili-Ravi buffaloes raised at commercial farms of Pakistan. *Buffalo Bulletin (Thailand)* 32(2): 1170-1173.
- Jennes, R. (1988). Composition of milk: In Fundamentals of dairy chemistry (Wong, N.P.). Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp1-38.
- Khosroshahi, Z. T., Rafat, S. A., Shoja, D. (2011). Effects of non-genetic factors in milk production and composition in East Azarbaijan native buffaloes of Iran. *Buffalo Bulletin* 30 (3): 202-209.
- Kınık, Ö., Yerlikaya, O. (2015). Manda sütü ve özellikleri. Sidas Medya Ltd. Şti. Fevzipaşa Bulvarı Çelik İş Merkezi. İzmir. 56s.
- Koyuncu, M., Çetin, İ., Sargın, H. G., Çetin, E. (2021). Bursa ili Mustafakemalpaşa ilçesi manda yetiştiriciliği "Karaoğlan mahallesi örneği". *Journal of Animal Production* 62 (1): 25-34.

- Kurt, A. (1977). Süt teknolojisine giriş. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları no:230. Erzurum.
- Kurt, A., Çakmakçı, S., Çağlar, A. (1996). Süt ve mamülleri muayene analiz metodları rehberi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayın no: 18, Erzurum.
- Metin, M. (2005). Süt teknolojisi. sütün bileşimi ve işlenmesi. E. Ü. Mühendislik Fakültesi Yayınları No: 33, İzmir.
- Metry, G.H. (1996). The Main dairy animal in Egypt. Academy of Scientific and Technology. pp 39.
- Rodriguez-Zas, S.L., Gianola, D., Shook, G.E. (2000). Evaluation of models for somatic cell score lactation patterns in Holsteins. *Livestock Production Science* 67: 19-30.
- Salari, F., Altomonte, I., Martini, M. (2013). Buffalo milk: a case study of some parameters related to milk production. *Large Animal Review* 19: 17–20.
- Sarıözkan, S. (2011). Türkiye’de manda yetiştiriciliği’nin önemi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 17 (1):163-166.
- Sezgin, E. (2010). Fermente süt ürünleri teknolojisi. Süt Teknolojisi. (Editör: Prof. Dr. Atıla Yetişemiyen). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Yayınları no: 1560 s: 101-136. Ankara.
- Soysal, M. İ., Güven, H., Gurcan, E. K., Genc, S. (2015). The estimation of lactation milk record with partial milk record in Anatolian water buffalo. 8th Asian Buffalo Congress, Poster presentation, p.67, April 21-25, Istanbul, Türkiye.
- Summer, A., Franceschi, P., Malacarne, M., Formaggioni, P., Tosi, F., Tedeschi, G., Mariani, P. 2009. Influence of somatic cell count on mineral content and salt equilibria of milk. *Ital. J. Anim. Sci.* 8 (Suppl. 2): 435-437.
- Şahin, A., Ulutaş, Z. (2014). Anadolu mandalarının değişik metotlara göre tahmin edilen süt verimleri üzerine bazı çevresel faktörlerin etkilerinin belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 20 (1): 79-85.
- Şahin, A., Ulutaş, Z., Yıldırım, A., Kul, E., Aksoy, Y., Uğurlutepe, E., Sözen, Ö., Kaplan, Y. (2016). The effect of some environmental factors on milk composition of Anatolian buffaloes. *Scientific Papers: Series D. Animal Science* LIX: 57-64.
- Şahin, A., Yıldırım, A., Ulutaş, Z. (2012). Tokat ili halk elinde yetiştirilen mandaların çiğ süt kompozisyonu ve somatik hücre sayısı. Gaziosmanpaşa Üniv. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Sonuç Raporu, Proje No:2011/13.
- Şahin, G. (2015). Türkiye zirai hayatında manda (*Bubalus bubalis*) yetiştiriciliği ve manda ürünlerinin değerlendirilmesi. *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Dergisi* 31:14-40.
- Şekerden, Ö. (1999). Anadolu mandalarında süt kompozisyonunu etkileyen faktörler ve süt kompozisyonunun laktasyon dönemlerine göre değişimi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 23: 505-509.
- Şekerden, Ö. (2001). Büyükbaş hayvan yetiştirme (manda yetiştiriciliği). Temizyürek Ofset Matbaacılık. 296 s., Hatay.
- Şekerden, Ö., Avşar, Y. K. (2008). Anadolu mandalarında süt kompozisyonu, rennet pıhtılaşma süresi, üre muhtevası ve bunları etkileyen çevre faktörleri. *Hayvansal Üretim* 49 (2): 7-14.
- Şekerden, Ö., Küçükkebaççı, M. (1999). Afyon Kocatepe Tarımsal Araştırma Enstitüsü Anadolu mandalarında süt verim ve bileşiminin laktasyon dönemlerine göre değişimi, süt ve bazı döl verim özellikleri. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 30 (2): 151-159.
- Toparlan, E., Mercan, L. (2018). Türkiye yerli manda popülasyonlarında yapılan moleküler genetik çalışmalar. *Akademia Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi* ICAE Özel Sayı: 146-158.
- TÜİK (2022). Türkiye İstatistik Kurumu. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Hayvansal-Uretim-Istatistikleri-2022-49682> (Erişim Tarihi: 11.03.2022).
- TÜİK, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim Tarihi: 20.05.2020).

USK (2016). Ulusal Süt Konseyi. <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/yillar-itibariyle-buyukbas-ve-kucukbas-hayvan-varligi-513/> Erişim tarihi: 27.4.2023.

USK (2020). Ulusal Süt Konseyi. <https://ulusalsutkonseyi.org.tr/ulusal-sut-konseyi-sut-raporu-2020-3639/> Erişim Tarihi: 27.01.2022.

Waldner, D.N., Stokes, S.R., Jordan, E.R., Looper, M.L., 2002. Managing milk composition: Normal sources of Variation. <http://www.ansi.okstate.edu/exten/dairy/wf-4016.html>, 06.06.2003.

Yadav, S. P., Sikka, P., Kumar, D., Sarkar, S. K., Pandey, A., Yadav, P. S., Sethi, R. K. (2013). Variation in milk constituents during different parity and seasons in Murrah buffaloes. *Indian Journal of Animal Science* 83 (7). 747–751.

Yılmaz, A., Ocak, E., Kose, S. (2017). A research on milk yield, milk composition and body weights of Anatolian buffaloes. *Indian Journal of Animal Research* 51 (3): 564-569.



**SCREENING THE ALKALI-NEUTRALIZED SUNFLOWER SEED OIL  
BLEACHING ABILITY OF SOME NATURAL AND ACID-ACTIVATED  
NATURAL CLAYS, SYNTHETIC ADSORBENTS, AND METAL-ORGANIC  
FRAMEWORKS**

**Emin Yılmaz\*, Elif Yüce**

Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Çanakkale,  
Türkiye

Received /Geliş: 04.04.2023; Accepted / Kabul: 25.05.2023; Published online / Online baskı: 07.06.2023

Yılmaz, E., Yüce, E. (2023). Screening the alkali-neutralized sunflower seed oil bleaching ability of some natural and acid-activated natural clays, synthetic adsorbents, and metal-organic frameworks, GIDA (2023) 48 (3) 653-669 doi: 10.15237/ gida.GD23046

Yılmaz, E., Yüce, E. (2023). Bazı doğal ve asit-aktif doğal killerin, sentetik adsorbanların ve metal-organik çerçevelerin alkali-nötrale ayıçığı yağı ağartma yeteneklerinin incelenmesi. GIDA (2023) 48 (3) 653-669 doi: 10.15237/ gida.GD23046

**ABSTRACT**

The aim of this study was to search vegetable oil bleaching abilities of 30 different adsorbent materials placed into four groups (natural clay, acid-activated natural clay, synthetic adsorbent, metal-organic frames). After oil treatment against control sample, oil color (L, a\*, b\* values), oil weight loss (%), free fatty acidity (FFA), peroxide value (PV), and the specific extinctions of K<sub>232</sub> and K<sub>270</sub> were measured. Based on the data analysis, natural montmorillonite, acid-activated halloysite, Dowex, and Ti-MOF were selected, and tested in the same way against two commercial bleaching earth (C.B.E.) samples. Finally, an equal weight portion mixture of the four selected adsorbents were prepared and tested against C.B.Es. Results indicated that acid activated halloysite and Dowex had certain potentials to be implemented in oil bleaching. In conclusion, some other clay modification techniques suggested being applied to those potential adsorbents to improve their bleaching activity for potential commercial applications.

**Keywords:** Natural clays, synthetic adsorbents, MOF, bleaching, screening

**BAZI NATURAL VE ASİT-AKTİVE NATURAL KİLLERİN, SENTETİK  
ADSORBANLARIN VE METAL-ORGANİK ÇERÇEVELERİN ALKALİ-  
NÖTRALİZE AYIÇIĞI YAĞI AĞARTMA YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ**

**ÖZ**

Bu çalışmanın amacı dört grup altında (natürel kil, asit-aktif natürel kil, sentetik adsorban, metal-organik kafes) toplanmış 30 farklı adsorbentin bitkisel yağ ağartma kapasitelerinin araştırılmasıdır. Ağartma işlemi sonrasında yağlarda, yağ rengi (L, a\*, b\* değerleri), yağ ağırlık kaybı (%), serbest yağ asitliği (SYA), peroksit değeri (PD), ve K<sub>232</sub> ile K<sub>270</sub> özgül sönümlenme katsayıları ölçülmüştür. Veri analizi sonucunda, doğal montmorillonit, asit-aktif halloysit, Dowex ve Ti-MOF seçilmiş, ve aynı yolla ticari ağartma topraklarına karşı test edilmiştir. Nihayet, seçilmiş adsorbanların eşit ağırlıklı bir karışımı hazırlanmış ve yine ticari örneklere karşı test edilmiştir. Asit-aktif halloysit ve Dowex'in

\* Corresponding author / Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: eyilmaz@comu.edu.tr

☎: (+90) 286 218 0018/20054

☎: (+90) 286 218 0541

Emin Yılmaz; ORCID ID: 0000-0003-1527-5042

Elif Yüce; ORCID ID: 0000-0002-0033-644X

diğerlerinden daha yüksek ağartma potansiyeli olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, bazı kil modifikasyon tekniklerinin bu potansiyel adsorbanlara uygulanarak ticari uygulamalar için kapasitelerinin artırılabilceği değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Doğal killer, sentetik adsorbanlar, MOF, ağartma, tarama

## INTRODUCTION

The massive edible vegetable oil production system relies on extraction of crude oils from the oil seeds by pressing, solvent extraction or combination of both techniques. The generated crude oils contain some impurities (residual solvents, pesticides, Maillard products, etc.) which prevent their immediate acceptance by the consumers due to their health risk and sensory taints. Consequently, the crude oils have been refined by classical processes or physical refining operations. Usually classical refining involves consequent unit operations of degumming, alkali neutralization, bleaching, deodorization, winterization and polishing. Sometimes, one or two of these processes could be omitted depending on the condition of the crude oil being refined (Anderson, 1996; O'Brien, 2004).

Bleaching is the adsorptive removal of color pigments from the crude vegetable oils by adsorbent clays. The oil mixed with selected adsorbents (natural clays, activated clays and carbons, synthetic silicates, silica gel and others) at around 75-110 °C, mixed for 15-30 min under vacuum, and filtered. By this process not only color pigments (carotenoids, chlorophylls, gossipol, Maillard compounds etc.), but also some residual soaps and phosphatides, oxidation products, trace metals, the polyaromatic hydrocarbons (PAH) if present, and some pesticides were removed by adsorption principle onto and inside the adsorbent material used, and removed by filtration. The ratio of oil and adsorbent clay, efficient mixing, duration of mixing, process temperature, efficiency of the filters are the most important factors in addition to the adsorptive capacity and affinity of the clays used (Hodgson, 1996; Zschau, 2001).

Thereby, one research challenge is to find effective new adsorbents and/or modify them for the best bleaching with affordable feasibility. Further, minimization of neutral oil losses and highest possible retention of minor nutrients like

phytosterols and tocopherols were anticipated. Activated carbon, natural and activated clays (bentonite, palygorskite, sepiolite, montmorillonite, alumina and magnesium silicates, Fuller's earth, silica gel, etc.), and filter aids like kieselguhr, perlite, pulp, and organic powders have been implemented in oil bleaching industry (Boki et al., 1992; Zschau, 2001; O'Brien, 2004). Further, acid modified bentonite (Didi et al., 2009), modified kaolin (Worasith et al., 2011), and sepiolite (Sabah et al., 2007), active carbon (Zhang et al., 2018), silica gel and silicates (Gil et al., 2014), Magnesol XL (Srimiati et al., 2015), chitin (Samonin et al., 2021), and amberlite (Jamal and Boulanger, 2010) have searched for crude oil bleaching abilities. New adsorbent materials like synthetic porous materials, the metal-organic frameworks (MOFs), have tested for crude oil bleaching (Vlasova et al., 2016; Yılmaz et al., 2019). Since the material scientists and mining engineers develop new clays and adsorbents, more research will be done for better crude edible oil bleaching.

In this study, selected natural clays (halloysite, zeolite, bentonite, sepiolite, kaolin, montmorillonite) and their acid modified versions, some selected synthetic adsorbents (molecular sieve Å, Magnesol XL, amberlites IR400, IR120, and XAD7, silica gel blue, silica gel 60, Dowex, chitin, and active carbon), and some selected metal-organic frameworks (Ti-MOF,  $\gamma$ -CD-MOF, Cr-MOF, Al-MOF, Zn-MOF, Mg-MOF, HKUST-MOF, MIL-53-MOF) were screened for edible oil bleaching ability. As far as we searched, the halloysite, molecular sieve Å, the amberlites selected, silica gel blue, Dowex, HKUST-MOF, and MIL-53-MOF were screened for bleaching purpose for the first time in this study. Further, others were included together with two different commercial bleaching earths for comparison purpose.

The aims of this study were to screen various potential adsorbent materials for their ability for

crude vegetable oil bleaching, and compare them among themselves and with commercial bleaching earths to select the best performing candidates under laboratory experimental conditions for further studies.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Degummed and alkali-neutralized, unbleached crude sunflower seed oil was provided by the Trakya Birlik Oil Co. (Çorlu, Türkiye). The adsorbent materials used in this study with their source firms were following: Halloysite (Esan Co., Eskişehir, Türkiye), Zeolite (Türkzeolit Mining Co., Balıkesir, Türkiye), Bentonite (Rota Mining Co., İstanbul), Sepiolite (Madkim Mining and Chem. Co., İstanbul), Kaolin (Kaolin Industrial Mines Co., İstanbul), Montmorillonite (Rota Mining Co., İstanbul), Molecular Sieve Å (Sigma, St. Louis, USA), Magnesol XL (The Dallas Group of America, Inc., Jeffersonville, IN, USA), Amberlite IR-400, Amberlite IR-120, and Amberlite XAD-7 (Sigma, St. Louis, USA), Silica Gel Blue and Silica Gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany), Dowex (Sigma, St. Louis, USA),

Chitin (Jinan Qinmu Fine Chem. Co. Ltd., China), and Active Carbon (Zag Kimya, İstanbul). In addition, the 8 different MOFs were synthesized in our laboratory following the procedure given in the references. The Ti-MOF (Vlasova et al., 2016),  $\gamma$ -CD-MOF (Smaldone et al., 2010), Cr-MOF (Li et al., 2014), Al-MOF (Ma et al., 2014), Zn-MOF (Bu et al., 2012), Mg-MOF (Spanopoulos et al., 2015), HKUST-MOF (Naeimi and Faghihian, 2017), and MIL-53-MOF (Pu et al., 2018) were synthesized. Lastly, two commercial bleaching earths, the Amcol 930 (from Trakya Birlik Oil Co.) and Pure-Flo Supreme B81 (from Ata Endüstriyel Prod. Industry and Trade Ltd. Co., İstanbul) were provided. The adsorbent materials used in this study could be observed from Figure 1. The adsorbents were used as they received from the firms or synthesized in our laboratory. Their particle size were not measured, but they were ranged from fine dust to gritty small spheres. All other chemicals, standards and solvent used in the analyses were of analytical grade, and purchased from Sigma Chem Co. (St. Louis, USA) and Merck (Darmstadt, Germany).

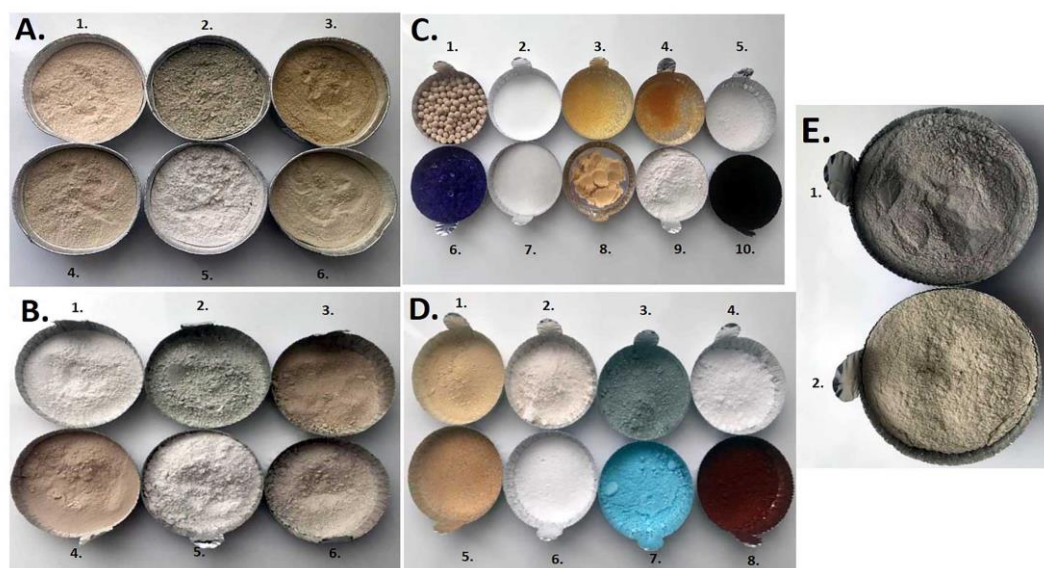


Figure 1. The natural (A) and acid-modified natural (B) adsorbents (1.Halloysite, 2.Zeolite, 3.Bentonite, 4.Sepiolite, 5.Kaolin, 6.Montmorillonite), synthetic (C) adsorbents (1.Molecular Sieve Å, 2.Magnesol XL, 3.Amberlite IR400, 4.Amberlite IR120, 5.Amberlite XAD7, 6.Silica Gel Blue, 7.Silica Gel 60, 8.Dowex, 9.Kitin, 10.Aktive Carbon), metal-organic frameworks (D) (1.Ti-MOF, 2. $\gamma$ -CD-MOF, 3.Cr-MOF, 4.Al-MOF, 5.Zn-MOF, 6.Mg-MOF, 7.HKUST-MOF, 8.MIL 53-MOF), and commercial bleaching earths (E, 1. Amcol 930, 2. Pure-Flo Supreme B81) used in this study.



### Activation of the Natural Clays and Amberlites

The acid-activation of the six natural clays were completed by first mixing each clay with 30% HCl at 1:5 (w/v) ratio and mixing under vacuum hood for 30 min. After that, the clay slurry were decanted, and washed with 10-fold pure water as many times as required to reach a decantation liquid with neutral pH. Finally, activated clays were dried at 150 °C for 5 h inside a vacuum incubator. These six clays were grouped as acid-activated natural clays.

The three amberlite resins studied under the synthetic adsorbents group were also activated before applications. The Amberlite IR400 were placed in 4 N HCl, and slowly mixed for 24 h, before filtration and washing until the collected washing liquid reached to pH 7.0. Finally, it was dried in the same way explained above (Mishra and Kar, 2003). The Amberlite IR120 was activated in a similar procedure but in 4 N NaOH solution (Mishra and Kar, 2003). Lastly, the Amberlite XAD7 was activated by washing it with plenty of pure water at room temperature for 4 times before drying it at 40 °C under vacuum for 48 h (Ribeiro et al., 2002).

### Treatment of the Crude Sunflower Oil with the Adsorbents

There were 4 treatment groups; the first group was named the natural clays, and included natural halloysite, zeolite, bentonite, sepiolite, kaolin, and montmorillonite. The second group was the acid-activated natural clays and included the same six clays after the modifications. The third group included 10 adsorbents (molecular sieve Å, Magnesol XL, Amberlites IR400, IR120, XAD7, silica gel blue, silica gel 60, Dowex, chitin, and active carbon), and named the synthetic adsorbents group. Lastly 8 MOFs (Ti-MOF,  $\gamma$ -CD-MOF, Cr-MOF, Al-MOF, Zn-MOF, Mg-MOF, HKUST-MOF, MIL-53-MOF) included the metal-organic frameworks group. In addition, there were two commercial bleaching earth (Amcol 930 and Pure-Flo Supreme B81), one adsorbent mixture prepared after the first part of this study, and one control sample treated in the same way.

The adsorbent treatment procedure briefly was as following; 10 g of crude oil was weighed into a glass beaker, and 0.3 g of the adsorbent was weighed and added into the oil. The mixture was stirred at 280 rpm at room temperature for 1 h. Finally, the oil-adsorbent slurry was filtered through Whatman no. 40 filter paper under natural gravity. The collected oil was placed into tubes, flashed with nitrogen gas before tightly capping. Finally, the tubes stored in refrigerator during the analyses. The effect of treatment temperatures were not studied in this study, and temperature as a factor could be considered in future studies.

### Selection of the Best Performing Adsorbents and Preparation of the Adsorbent Mixture

After the treatments, the oils were analyzed for instrumental color, weight loss, free fatty acidity (FFA), peroxide value (PV), and specific extinction ( $K_{232}$  and  $K_{270}$ ) values. All treatments were compared with control sample (no adsorbent treatment) and among themselves within each group to select the best one adsorbent from each of the 4 treatment groups. Selection was based on judgement of the analyses results yielding the best bleaching activity with minimal oil loss and lowest possible free fatty acidity and oxidation values. Consequently, montmorillonite from natural clays group, halloysite-AA from acid-activated natural clays group, Dowex from synthetic adsorbents group, and Ti-MOF from the MOF group were selected. These selected 4 adsorbents and the two commercial bleaching earths (C.B.E.-I and C.B.E.-II) were treated in the same way against control sample (no adsorbent treatment) to get a comparison among themselves. Finally, the 4 selected adsorbents were mixed in 1:1 weight ratio to prepare the 'adsorbent mixture' as a new adsorbent. This new adsorbent was also compared with the C.B.E.s and control sample in the same way.

### Analyses of the Treated Oil Samples

After each treatment, the oil was weighed by a Sartorius ED2245 scale (Sartorius, Germany), before placing it into glass tubes, and the weight loss (%) values were calculated, since the initial weight was known. The color of the treated oil

samples was assessed with a Minolta CR-400 colorimeter (Minolta Camera Co., Osaka, Japan). The oil sample was placed into the liquid sample holder of the instrument and several readings of color values (CIE standards) were recorded. The L value indicating brightness/darkness,  $a^*$  value indicating redness (+) / greenness (-), and  $b^*$  value indicating yellowness (+) / blueness (-) were measured.

The FFA of oil samples was measured following American Oil Chemists' Society (AOCS) method Ca 5a-40, and the PV was measured following AOCS method Cd 8-53 (AOCS, 1998), respectively. Finally, the specific extinction values of  $K_{232}$  and  $K_{270}$  were measured according to AOCS method Ch 5-91 (1998) with a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu UV-1800, Shimadzu Co., Japan).

### Statistical Analysis

In this study all experimental layouts were completed two times as two replicates. Within each replicate the analyses were done for three times. The data were reported as the mean with standard deviation of the six measurements. Comparison of the samples were accomplished by means of one-way ANOVA and Tukey's test at  $P \leq 0.05$ . The Minitab v.16.1 software (Minitab, 2010) was used for the statistical analyses.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### The Oil Bleaching Ability of the Natural Clays

Analytical values of the crude oils treated with the six natural adsorbents against control sample are presented in Table 1. The treated oil samples could be observed in Figure 2. The CIE color dimension of the L value indicates the brightness level of a sample and takes values from 0 (full dark or black) to 100 (full bright or white) (Pomeranz and Meloan, 1994). Compared with the control sample (30.28), zeolite (31.78) and kaolin (31.25) treated samples showed some improvements (lightening), but most importantly the other natural clays (halloysite, bentonite, sepiolite, and montmorillonite) yielded small decreases of brightness after treatment. This is an unexpected finding, but might be due to inefficient filtering of

the very fine clay dusts at the laboratory conditions (Whatman no. 40 filter paper). Some small particles of the clays could not be separated from oil, and hence may caused little increments of the L values. The  $a^*$  value shows the level of redness in the positive number direction, and greenness in the negative number direction (Pomeranz and Meloan, 1994). Compared with control sample (- 1.35), all samples had a little higher  $a^*$  values. Green tone was dominant in montmorillonite and bentonite treated samples. In vegetable oils, green color is caused by the presence of chlorophyll, while red-yellow tones are resulted from various carotenoids (O'Brien, 2004). Generally, decrease in one class pigments causes enhancement of the visibility of the other group, if both have not decreased together. It could be concluded that montmorillonite and bentonite removed most of the red color pigments, but not the green color pigments. Similarly, the  $b^*$  color value shows yellow (+  $b^*$ ) and blue (-  $b^*$ ) colors. Clearly, all samples had some yellowness, but treatments with bentonite, kaolin, and montmorillonite yielded higher yellowness, and treatment with sepiolite resulted significantly lower yellowness. This might be due to their inefficiency to remove the yellow colored pigments or most possibly their efficient removal ability for the red pigments. Contrarily, sepiolite was quite efficient to remove yellow colored pigments. Overall, as long as pigment removal ability considered, the most efficient natural clays were montmorillonite, bentonite and sepiolite. It was indicated that natural clays with layers of silicates such as bentonite, palygorskite, and sepiolite had high surface area, and could be used for oil decolorization, but also it was indicated that highest surface area was not yielded the highest bleaching (Zschau, 2001). In an early study (Boki et al., 1992), natural bentonites, sepiolites and montmorillonites were compared and sepiolites were suggested as the best adsorbents.

After the treatment, the total oil weight loss (%) values was also calculated (Table 1). The halloysite, bentonite and montmorillonite had lower weight loss values than zeolite, sepiolite and kaolin treatments. Generally, all weight loss values

were above 18%. This is an important quantity, which cause economical losses. Weight loss of bleached oils has been indicated as an important factor in selecting optimum bleaching technique, and numbers ranging from 5% to 40% have been

reported. It was also indicated that weight loss was related with the adsorbents affinity to bind neutral oil as well as to adsorbent addition level, process duration and filter efficiency (Hodgson, 1996; Zschau, 2001; O'Brien, 2004).

Table 1. The color and weight loss values, and chemical parameters measured for the oil samples treated with the natural clays.

|                 | L Value                            | a* Value                                  | b* Value                                   | Weight Loss (%)                            |
|-----------------|------------------------------------|---|--|--|
| Control         | 30.28±0.44 <sup>a*</sup>           | -1.35±0.07 <sup>c</sup>                   | 6.23±0.27 <sup>b</sup>                     | —  |
| Halloysite      | 29.73±0.63 <sup>b</sup>            | -1.51±0.13 <sup>c</sup>                   | 6.37±1.04 <sup>b</sup>                     | 18.86±0.21 <sup>c</sup>                    |
| Zeolite         | 31.78±0.75 <sup>a</sup>            | -1.47±0.05 <sup>d</sup>                   | 6.53±0.35 <sup>b</sup>                     | 19.06±0.33 <sup>b</sup>                    |
| Bentonite       | 28.10±0.29 <sup>b</sup>            | -1.70±0.06 <sup>b</sup>                   | 7.69±0.50 <sup>a</sup>                     | 18.21±0.21 <sup>c</sup>                    |
| Sepiolite       | 29.43±0.04 <sup>b</sup>            | -1.44±0.08 <sup>d</sup>                   | 4.41±0.19 <sup>c</sup>                     | 20.08±0.38 <sup>a</sup>                    |
| Kaolin          | 31.25±1.33 <sup>a</sup>            | -1.45±0.08 <sup>d</sup>                   | 7.05±0.29 <sup>a</sup>                     | 19.01±0.27 <sup>b</sup>                    |
| Montmorillonite | 28.30±1.11 <sup>b</sup>            | -1.76±0.15 <sup>a</sup>                   | 7.97±0.76 <sup>a</sup>                     | 18.19±0.15 <sup>c</sup>                    |
|                 | Free Fatty Acidity<br>(% Linoleic) | Peroxide Value<br>(meqO <sub>2</sub> /kg) | Specific<br>Extinction (K <sub>232</sub> ) | Specific Extinction<br>(K <sub>270</sub> ) |
| Control         | 1.01±0.00 <sup>a†</sup>            | 17.73±0.20 <sup>c</sup>                   | 2.49±0.00 <sup>f</sup>                     | 0.41±0.00 <sup>d</sup>                     |
| Halloysite      | 0.62±0.05 <sup>d</sup>             | 17.74±0.28 <sup>c</sup>                   | 3.51±0.01 <sup>a</sup>                     | 0.83±0.00 <sup>a</sup>                     |
| Zeolite         | 0.96±0.05 <sup>b</sup>             | 20.65±0.74 <sup>a</sup>                   | 3.18±0.02 <sup>c</sup>                     | 0.48±0.00 <sup>b</sup>                     |
| Bentonite       | 0.89±0.01 <sup>c</sup>             | 19.44±0.45 <sup>b</sup>                   | 3.20±0.01 <sup>c</sup>                     | 0.44±0.00 <sup>c</sup>                     |
| Sepiolite       | 0.50±0.05 <sup>e</sup>             | 18.63±0.29 <sup>b</sup>                   | 3.33±0.02 <sup>b</sup>                     | 0.50±0.00 <sup>b</sup>                     |
| Kaolin          | 0.96±0.05 <sup>b</sup>             | 20.15±0.21 <sup>a</sup>                   | 3.15±0.02 <sup>d</sup>                     | 0.41±0.00 <sup>d</sup>                     |
| Montmorillonite | 0.44±0.01 <sup>f</sup>             | 19.38±0.35 <sup>b</sup>                   | 3.02±0.02 <sup>e</sup>                     | 0.31±0.00 <sup>e</sup>                     |

\*Small uppercase letters indicate the statistically significant differences within each column for the mean±SD values calculated from four determinations by one-way ANOVA and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

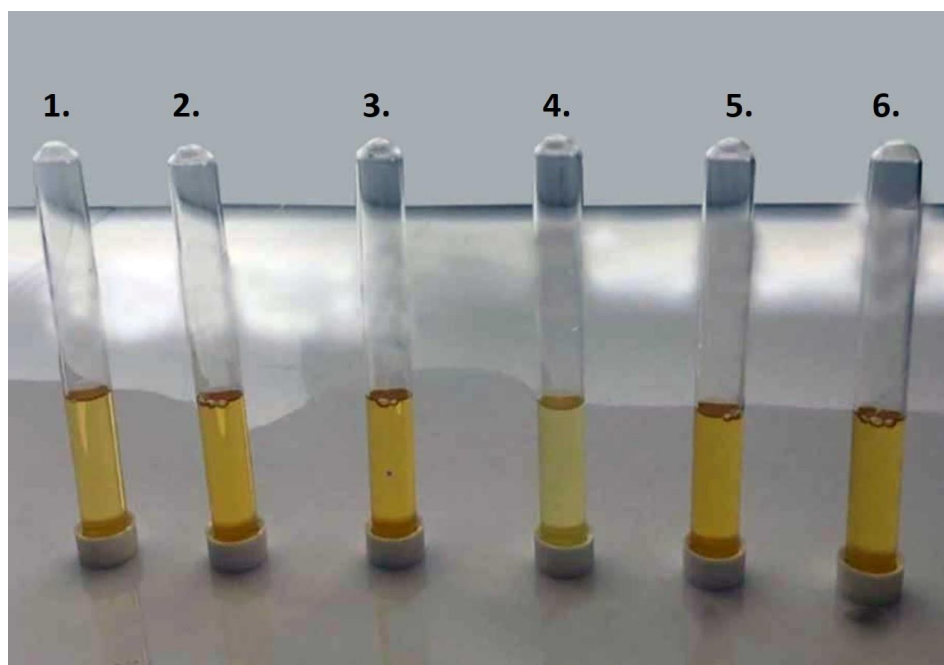


Figure 2. The oil samples treated with natural adsorbents (1. Halloysite, 2. Zeolite, 3. Bentonite, 4. Sepiolite, 5. Kaolin, 6. Montmorillonite).

Some chemical quality parameters of the treated oil samples were also measured (Table 1). The free fatty acidity (FFA) of control sample was 1.01% linoleate, and all treated samples had lower FFA values than the control sample. FFA reduction was the most with montmorillonite treated sample (0.44%) followed by sepiolite (0.505), and halloysite (0.62%) treated samples, respectively. Since the control oil sample was alkali-neutralized one, its low FFA was expected, and further reduction after adsorbent treatments could be accounted a good side benefit. Generally natural clays were found good adsorbents in terms of adsorbing the free fatty acids. Similar findings were reported previously for various natural adsorbents (Zschau, 2001; O'Brien, 2004). The peroxide values (PV) indicated a different trend, and all treated samples had PVs higher than that of the control sample (Table 1). PV indicates the level of active oxygen compounds in an oil sample, and it is limited in refined vegetable oils to a max value of 10 meq O<sub>2</sub>/kg oil sample (TGK, 2012). All treated samples and the control sample had PVs higher than the codex limit for refined oils. Since we used alkali-neutralized crude sunflower oil, this finding is quite expected. After all adsorbent treatments, the PV of samples enhanced compared to control sample (17.73 meq O<sub>2</sub>/kg oil) possibly due to long duration of the treatments including filtration time open to atmosphere. Since it was not possible to use a closed vacuum vessel in laboratory, the treatments were completed under atmospheric pressure, and consequently some oxidation were occurred. Among the treatments, some enhanced PV more than the others, and this might be due to some catalytic effect for oxidation or some physical effect of oxygen distribution in the oil. It is well known that under industrial conditions, bleaching process is always done under hermetic condition with full vacuum. Consequently, one adsorbent with the best quality parameters and the lowest oil loss value could be selected omitting the PV, since in real applications PV will not be a problem because of the full vacuum application. The specific extinctions of K<sub>232</sub> and K<sub>270</sub> were also measured (Table 1). These parameters indicate the level of dienoid (hydroperoxides and conjugated dienes) and trienoid (carbonyl compounds and

conjugates) acids as the primary and secondary oxidation compounds. These parameters were defined for virgin olive oil as acceptable limits of 2.5-2.6 for K<sub>232</sub> and 0.22-0.25 for K<sub>270</sub>, respectively (TGK, 2017). Clearly, there are some primary oxidation products present in the treated samples in accordance with PV data. Further, secondary oxidation products were also present in the treated samples. Overall, for any adsorbent treatment or bleaching process, vacuum seems inevitable. When all findings were considered together (Table 1), montmorillonite was selected as the best one among the natural clays for bleaching treatment.

### **The Oil Bleaching Ability of the Acid-Activated Natural Clays**

The six natural clays were acid-activated as explained in the method section, and oil treatments were done in the same way. The analytical results of the oil samples are presented in Table 2, and the oils could be observed from Figure 3. Evaluation of the data will be in the same way as completed above to select one best adsorbent among the samples. All acid-activated natural clays enhanced the brightness level of the oil, but the highest brightness (L value) was observed in zeolite (34.79) treatment followed by halloysite (34.76). Similarly, green tones reduced most by sepiolite (- 0.92 a\* value) followed by halloysite (- 1.13 a\* value) treatment. The same trend was evident for yellowness, and b\* value was 2.61 for sepiolite and 3.88 for halloysite treatments. Clearly acid-activated sepiolite, halloysite and zeolite were better in color correction among others. The lowest weight loss value (12.08%) was with halloysite, and the highest (19.51%) was with sepiolite treatment. Further, if the acid-activated clays (Table 2) were compared to their natural forms (Table 1), it could be observed that acid activation enhanced their oil brightening ability and reduced oil loss values. Generally, acid activation could be accepted as a good strategy for natural clays to be used as oil bleaching agents. In this study, one type acid-activation treatment was applied to all clays, but in literature acid-activation with different factors were studied for individual clays. For example, the optimum activation process for bentonite was

determined as 31% acid concentration, 10 h contact time, and solid to acid ratio of 320 g/L for sulfuric acid (Didi et al., 2009). Likewise, 1 N 65%

HNO<sub>3</sub> acid-activation at room temperature for 1 h with 1:10 solid: liquid ratio yielded a significantly better sepiolite (Sabah et al., 2007).

Table 2. The color and weight loss values, and chemical parameters measured for the oil samples treated with the acid-activated natural clays.

|                    | L Value                         | a* Value                               | b* Value                                | Weight Loss (%)                         |
|--------------------|---------------------------------|--|---|---|
| Control            | 30.28±0.44 <sup>d*</sup>        | -1.35±0.07 <sup>d</sup>                | 6.23±0.27 <sup>c</sup>                  | —                                       |
| Halloysite-AA      | 34.76±1.44 <sup>a</sup>         | -1.13±0.07 <sup>e</sup>                | 3.88±0.18 <sup>d</sup>                  | 12.08±0.21 <sup>d</sup>                 |
| Zeolite-AA         | 34.79±2.47 <sup>a</sup>         | -1.63±0.24 <sup>c</sup>                | 7.14±0.32 <sup>b</sup>                  | 13.57±0.19 <sup>c</sup>                 |
| Bentonite-AA       | 31.59±0.54 <sup>c</sup>         | -1.95±0.08 <sup>a</sup>                | 8.71±0.39 <sup>a</sup>                  | 12.88±0.20 <sup>c</sup>                 |
| Sepiolite-AA       | 33.62±0.65 <sup>a</sup>         | -0.92±0.07 <sup>f</sup>                | 2.61±0.02 <sup>e</sup>                  | 19.51±0.49 <sup>a</sup>                 |
| Kaolin-AA          | 33.42±0.62 <sup>a</sup>         | -1.77±0.03 <sup>b</sup>                | 7.55±0.52 <sup>a</sup>                  | 16.64±0.24 <sup>b</sup>                 |
| Montmorillonite-AA | 32.13±1.09 <sup>b</sup>         | -1.78±0.13 <sup>b</sup>                | 7.87±0.46 <sup>a</sup>                  | 13.73±0.16 <sup>c</sup>                 |
|                    | Free Fatty Acidity (% Linoleic) | Peroxide Value (meqO <sub>2</sub> /kg) | Specific Extinction (K <sub>232</sub> ) | Specific Extinction (K <sub>270</sub> ) |
| Control            | 1.01±0.00 <sup>at</sup>         | 17.73±0.20 <sup>a</sup>                | 2.49±0.00 <sup>f</sup>                  | 0.41±0.00 <sup>g</sup>                  |
| Halloysite-AA      | 0.92±0.00 <sup>b</sup>          | 7.83±0.35 <sup>f</sup>                 | 3.99±0.00 <sup>b</sup>                  | 1.68±0.00 <sup>d</sup>                  |
| Zeolite-AA         | 0.99±0.04 <sup>a</sup>          | 11.07±0.33 <sup>c</sup>                | 4.00±0.00 <sup>a</sup>                  | 2.18±0.00 <sup>b</sup>                  |
| Bentonite-AA       | 0.91±0.01 <sup>c</sup>          | 10.25±0.39 <sup>d</sup>                | 3.16±0.00 <sup>e</sup>                  | 0.57±0.00 <sup>f</sup>                  |
| Sepiolite-AA       | 0.92±0.00 <sup>b</sup>          | 13.94±0.12 <sup>b</sup>                | 3.51±0.01 <sup>d</sup>                  | 1.40±0.00 <sup>e</sup>                  |
| Kaolin-AA          | 0.92±0.00 <sup>b</sup>          | 11.20±0.43 <sup>c</sup>                | 4.00±0.01 <sup>a</sup>                  | 2.07±0.00 <sup>c</sup>                  |
| Montmorillonite-AA | 0.92±0.01 <sup>b</sup>          | 9.43±0.35 <sup>e</sup>                 | 3.75±0.02 <sup>c</sup>                  | 2.47±0.00 <sup>a</sup>                  |

\*Small uppercase letters indicate the statistically significant differences within each column for the mean±SD values calculated from four determinations by one-way ANOVA and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

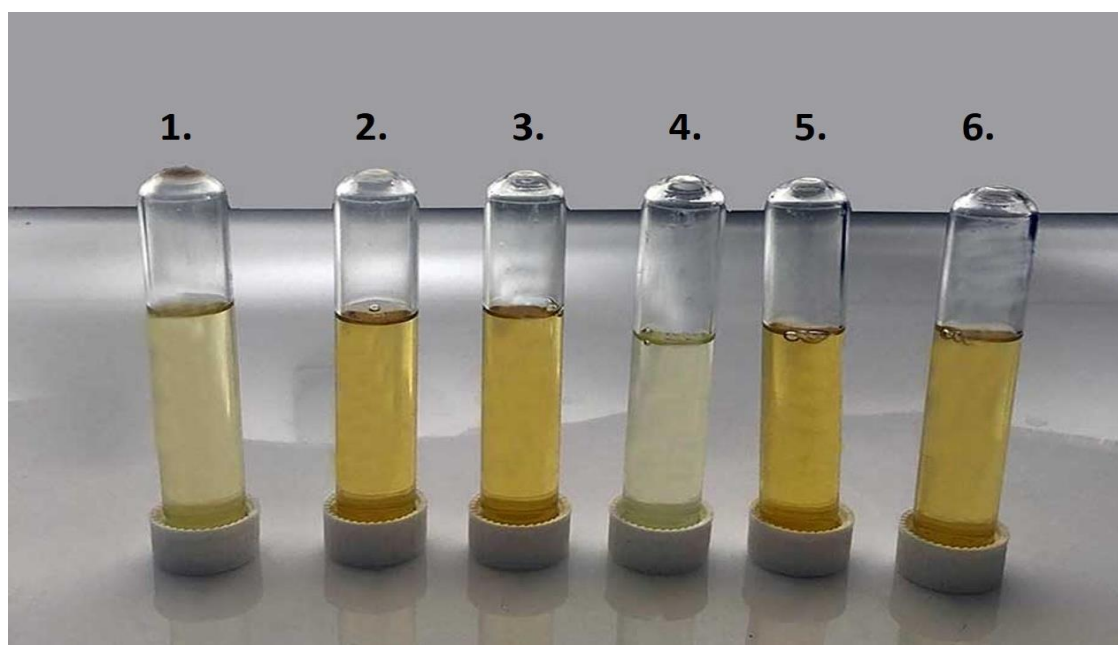


Figure 3. The oil samples treated with acid-activated natural adsorbents (1. Halloysit-AA, 2. Zeolite-AA, 3. Bentonite-AA, 4. Sepiolite-AA, 5. Kaolin-AA, 6. Montmorillonite-AA).

After the treatments, all FFA values were reduced compared to control sample (Table 2). There were small differences among the treatments, and FFA adsorption capacity was highest with bentonite treatment. The PV of all treated samples were lower than that of the control sample (Table 2), indicating that acid-activated clays were able to adsorb some peroxides. This was not evident with the natural clays (Table 1). PV reduction was highest with halloysite (8.83 meqO<sub>2</sub>/kg) treatment. This situation was not confirmed with the specific extinction values. There were some enhancement in both K<sub>232</sub> and K<sub>270</sub> values for the treatments compared with control sample. Consequently, some secondary oxidation must have taken place during the treatment duration. Similarly, vacuum or neutral gas atmosphere must be present during oil bleaching treatment.

After considering all findings together, the acid-activated halloysite was selected the best one among this group for further evaluation. Since there is no study in literature for halloysite for oil bleaching purpose, this finding could be important for further studies.

#### The Oil Bleaching Ability of the Synthetic Adsorbents

Ten different synthetic adsorbent were tested for oil bleaching purpose and the results of the

treated oil samples are summarized in Table 3. The treated oil samples are shown in Figure 4. Compared to control sample, some treatments enhanced oil brightness (Amberlite IR120, Amberlite XAD7, Dowex, Amberlite IR400 and molecular sieve Å), while some others (active carbon, chitin, silica gel 60, silica gel blue, Magnesol XL) decreased it. The negative a\* value in control sample (- 1.35) were increased in all treated samples. The highest a\* values were measured with Amberlite XAD, Amberlite IR400 and Dowex treated samples. In these samples, the level of greenness increased. This might be due to proportional decrease of pigments giving red color. The level of yellowness (b\* value) were mostly increased, only active carbon treatment decreased it. This is unexpected because adsorbents usually remove the yellow carotenoid pigments. It must be remembered that the carotenoid pigments yield colors from yellow to dark red and even to brown-red. Consequently, proportional decrease of a pigment could result a higher color value reading of the other pigment. For color correction activity, it seems that amberlites and Dowex were better among others. The oil weight loss values were also varied (Table 3). The lower weight loss values were in the order of Amberlite IR120 < Dowex < Amberlite IR400, respectively.

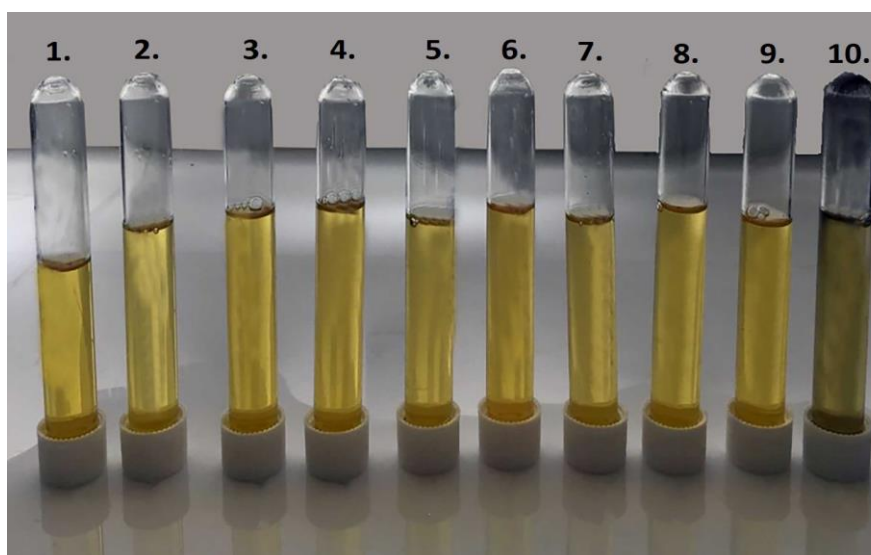


Figure 4. The oil samples treated with synthetic adsorbents (1. Molecular Sieve Å, 2. Magnesol XL, 3. Amberlite IR400, 4. Amberlite IR120, 5. Amberlite XAD7, 6. Silica Gel Blue, 7. Silica Gel 60, 8. Dowex, 9. Kitin, 10. Aktive Carbon).

Table 3. The color and weight loss values, and chemical parameters measured for the oil samples treated with the synthetic adsorbents.

|                   | L Value                         | a* Value                               | b* Value                                | Weight Loss (%)                         |
|-------------------|---------------------------------|--|---|---|
| Control           | 30.28±0.44 <sup>c*</sup>        | -1.35±0.07 <sup>f</sup>                | 6.23±0.27 <sup>d</sup>                  | –                                       |
| Molecular Sieve Å | 30.57±0.95 <sup>c</sup>         | -1.76±0.19 <sup>d</sup>                | 7.27±0.28 <sup>c</sup>                  | 16.91±0.24 <sup>b</sup>                 |
| Magnesol XL       | 29.45±0.83 <sup>d</sup>         | -1.80±0.13 <sup>c</sup>                | 6.73±0.58 <sup>d</sup>                  | 16.77±0.11 <sup>b</sup>                 |
| Amberlite IR400   | 31.46±0.80 <sup>b</sup>         | -2.10±0.15 <sup>a</sup>                | 9.42±0.71 <sup>a</sup>                  | 11.99±0.16 <sup>e</sup>                 |
| Amberlite IR120   | 33.19±0.61 <sup>a</sup>         | -2.01±0.04 <sup>b</sup>                | 9.19±0.25 <sup>a</sup>                  | 11.08±0.09 <sup>e</sup>                 |
| Amberlite XAD7    | 32.68±0.88 <sup>a</sup>         | -2.13±0.11 <sup>a</sup>                | 8.30±0.61 <sup>b</sup>                  | 16.36±0.28 <sup>b</sup>                 |
| Silica Gel Blue   | 27.77±0.35 <sup>c</sup>         | -1.81±0.05 <sup>c</sup>                | 7.78±0.35 <sup>c</sup>                  | 15.15±0.30 <sup>c</sup>                 |
| Silica Gel 60     | 27.77±0.36 <sup>c</sup>         | -1.67±0.09 <sup>d</sup>                | 6.70±0.68 <sup>d</sup>                  | 14.98±0.66 <sup>c</sup>                 |
| Dowex             | 32.28±0.20 <sup>b</sup>         | -2.03±0.07 <sup>b</sup>                | 8.44±0.38 <sup>b</sup>                  | 11.88±0.19 <sup>e</sup>                 |
| Chitin            | 27.39±0.04 <sup>e</sup>         | -1.97±0.09 <sup>b</sup>                | 7.92±0.17 <sup>c</sup>                  | 17.44±0.21 <sup>a</sup>                 |
| Active Carbon     | 27.41±0.31 <sup>e</sup>         | -1.48±0.03 <sup>e</sup>                | 5.21±0.20 <sup>e</sup>                  | 13.46±1.03 <sup>d</sup>                 |
|                   | Free Fatty Acidity (% Linoleic) | Peroxide Value (meqO <sub>2</sub> /kg) | Specific Extinction (K <sub>232</sub> ) | Specific Extinction (K <sub>270</sub> ) |
| Control           | 1.01±0.00 <sup>a*</sup>         | 17.73±0.20 <sup>g</sup>                | 2.49±0.00 <sup>f</sup>                  | 0.41±0.00 <sup>f</sup>                  |
| Molecular Sieve Å | 0.87±0.06 <sup>c</sup>          | 26.30±0.47 <sup>a</sup>                | 3.25±0.02 <sup>e</sup>                  | 0.35±0.00 <sup>b</sup>                  |
| Magnesol XL       | 0.86±0.05 <sup>c</sup>          | 22.70±0.22 <sup>d</sup>                | 3.48±0.00 <sup>d</sup>                  | 0.38±0.00 <sup>g</sup>                  |
| Amberlite IR400   | 0.97±0.06 <sup>a</sup>          | 24.21±0.01 <sup>c</sup>                | 3.93±0.01 <sup>b</sup>                  | 0.49±0.00 <sup>e</sup>                  |
| Amberlite IR120   | 1.03±0.01 <sup>a</sup>          | 21.79±0.47 <sup>f</sup>                | 4.00±0.00 <sup>a</sup>                  | 0.56±0.00 <sup>c</sup>                  |
| Amberlite XAD7    | 0.95±0.03 <sup>b</sup>          | 26.10±0.06 <sup>b</sup>                | 4.00±0.00 <sup>a</sup>                  | 0.52±0.00 <sup>d</sup>                  |
| Silica Gel Blue   | 0.92±0.01 <sup>b</sup>          | 21.56±0.19 <sup>f</sup>                | 3.93±0.07 <sup>b</sup>                  | 0.41±0.00 <sup>f</sup>                  |
| Silica Gel 60     | 0.96±0.05 <sup>a</sup>          | 22.18±0.44 <sup>e</sup>                | 4.00±0.00 <sup>a</sup>                  | 0.44±0.00 <sup>e</sup>                  |
| Dowex             | 0.80±0.00 <sup>d</sup>          | 8.47±0.33 <sup>i</sup>                 | 3.98±0.00 <sup>a</sup>                  | 0.49±0.00 <sup>e</sup>                  |
| Chitin            | 0.91±0.00 <sup>b</sup>          | 12.58±0.32 <sup>h</sup>                | 3.56±0.04 <sup>c</sup>                  | 0.59±0.00 <sup>b</sup>                  |
| Active Carbon     | 0.91±0.00 <sup>b</sup>          | 10.71±0.04 <sup>i</sup>                | 3.42±0.04 <sup>d</sup>                  | 0.79±0.00 <sup>a</sup>                  |

\*Small uppercase letters indicate the statistically significant differences within each column for the mean±SD values calculated from four determinations by one-way ANOVA and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

Compared to the control sample (1.01%), the lowest FFA value (0.80%) was measured in Dowex treated sample, followed by Magnesol XL (0.86%), respectively. A similar trend was evident for PV data. The lowest PV (8.47 meqO<sub>2</sub>/kg) was measured in the Dowex treated sample, and the highest (26.30 meqO<sub>2</sub>/kg) for molecular sieve Å treated sample compared with control (17.73 meqO<sub>2</sub>/kg). There was no similar study in literature for Dowex, and these findings could be important for further evaluations. Similar to the natural and

acid-modified natural clays groups, secondary peroxides adsorption patterns were not similar, and almost all treatment resulted higher specific extinction values than control sample.

Two mixed bed ion-exchange resins (Dowex Monosphere MR-450 UPW and Amberlite MB-150) were used to remove oleic acid from a laboratory-prepared 5% (w/w) oleic acid/soybean oil mixture (Jamal and Boulanger, 2010). Results indicated over 93% of free oleate



removal. Although there was no bleaching study, FFA removal ability of Dowex and amberlite resin was confirmed. Possibility of using chitin as ion exchange resin was discussed (Samonin et al., 2021), but application of chitin in oil bleaching has not been investigated. Silica gel 60 and activated carbon among some other adsorbents were studied to bleach soybean oil. Adsorption of FFA and lutein was highest with silica gel 60 (Gil et al., 2014). After evaluating the data presented in Table 3, the Dowex was selected as the most promising synthetic adsorbent for oil bleaching activity, and further analyses were completed.

### The Oil Bleaching Ability of the Metal-Organic Frameworks

Eight different metal-organic frameworks (MOF) were investigated for oil bleaching capacity evaluation in this study, and the analytical results of the treated oil samples against control are shown in Table 4, and the oils are presented in Figure 5. The highest L values were detected in Al-MOF (33.56), MIL-53-MOF (33.42) and Mg-

MOF (33.28) treated samples. These MOFs enhanced oil brightness, while only Ti-MOF treated sample a little decreased (29.59) it. Considering the  $a^*$  values, all treatment enhanced the level of greenness, or in other word they all reduced the amount of some red pigments. The yellow color reduction capacity of Al-MOF (5.20) and Ti-MOF (5.79) samples were higher than the rest. As color change respect, it seems that Al-MOF and Ti-MOF yielded the better results. On the other hand, Al-MOF yielded a very significantly higher (32.10%) oil loss value compared to the lower values of Cr-MOF (12.05%) and  $\gamma$ -CD-MOF (12.98%), respectively. The FFA reduction was highest in Al-MOF (0.64%),  $\gamma$ -CD-MOF (0.67%), and Ti-MOF (0.68%), respectively. The PV values from lower to higher were ordered as  $\gamma$ -CD-MOF < Ti-MOF < Cr-MOF, as could be observed from Table 4. There was no clear trend for secondary oxidation compounds, but the specific extinction of  $K_{232}$  showed an increase in all treated samples, and  $K_{270}$  values also indicated some enhancements.

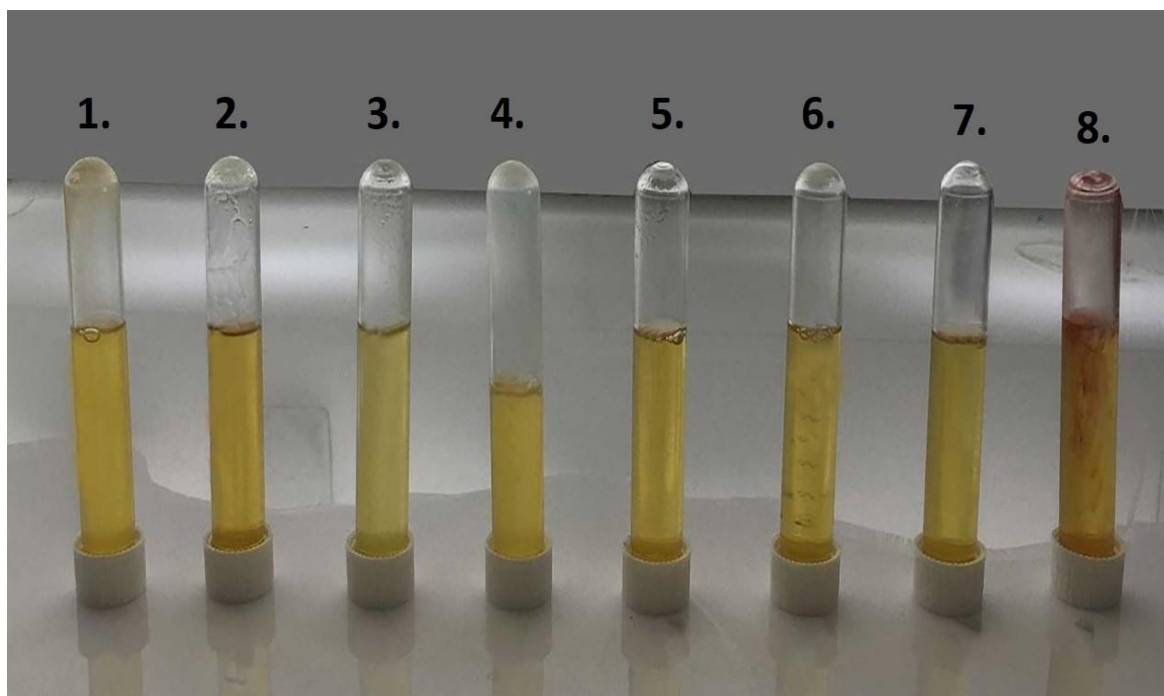


Figure 5. The oil samples treated with metal-organic frameworks (1. Ti-MOF, 2.  $\gamma$ -CD-MOF, 3. Cr-MOF, 4. Al-MOF, 5. Zn-MOF, 6. Mg-MOF, 7. HKUST-MOF, 8. MIL-53-MOF).



Table 4. The color and weight loss values, and chemical parameters measured for the oil samples treated with the metal-organic frameworks.

|            | L Value                            | a* Value                                  | b* Value                                   | Weight Loss (%)                            |
|------------|------------------------------------|---|--|--|
| Control    | 30.28±0.44 <sup>ce</sup>           | -1.35± 0.07 <sup>d</sup>                  | 6.23± 0.27 <sup>d</sup>                    | –  |
| Ti-MOF     | 29.59±0.67 <sup>d</sup>            | -1.35±0.04 <sup>d</sup>                   | 5.79±0.38 <sup>e</sup>                     | 16.08±0.80 <sup>c</sup>                    |
| γ-CD-MOF   | 32.66±1.08 <sup>b</sup>            | -1.55±0.15 <sup>b</sup>                   | 8.15±0.16 <sup>b</sup>                     | 12.98±0.45 <sup>f</sup>                    |
| Cr-MOF     | 30.91±0.19 <sup>c</sup>            | -1.52±0.02 <sup>b</sup>                   | 6.41±0.40 <sup>d</sup>                     | 12.05 ±0.13 <sup>f</sup>                   |
| Al-MOF     | 33.56±0.80 <sup>a</sup>            | -1.46±0.05 <sup>c</sup>                   | 5.20±0.34 <sup>e</sup>                     | 32.10±1.82 <sup>a</sup>                    |
| Zn-MOF     | 32.72±0.62 <sup>b</sup>            | -1.90±0.04 <sup>a</sup>                   | 8.83±0.65 <sup>a</sup>                     | 14.59±0.42 <sup>e</sup>                    |
| Mg-MOF     | 33.28±2.03 <sup>a</sup>            | -1.36±0.16 <sup>d</sup>                   | 7.11±0.21 <sup>c</sup>                     | 15.12±0.46 <sup>d</sup>                    |
| HKUST-MOF  | 32.38±0.81 <sup>b</sup>            | -1.90±0.06 <sup>a</sup>                   | 7.80±0.55 <sup>b</sup>                     | 17.01±0.91 <sup>b</sup>                    |
| MIL-53-MOF | 33.42±0.72 <sup>a</sup>            | -1.51±0.11 <sup>b</sup>                   | 8.12±0.22 <sup>b</sup>                     | 16.21±0.25 <sup>c</sup>                    |
|            | Free Fatty Acidity<br>(% Linoleic) | Peroxide Value<br>(meqO <sub>2</sub> /kg) | Specific<br>Extinction (K <sub>232</sub> ) | Specific<br>Extinction (K <sub>270</sub> ) |
| Control    | 1.01±0.00 <sup>a</sup>             | 17.73±0.20 <sup>b</sup>                   | 2.49±0.00 <sup>g</sup>                     | 0.41±0.00 <sup>e</sup>                     |
| Ti-MOF     | 0.68±0.01 <sup>d</sup>             | 12.50±0.16 <sup>g</sup>                   | 3.28±0.02 <sup>f</sup>                     | 0.55±0.00 <sup>c</sup>                     |
| γ-CD-MOF   | 0.67±0.00 <sup>d</sup>             | 9.31 ±0.25 <sup>h</sup>                   | 3.83±0.10 <sup>b</sup>                     | 2.26±0.00 <sup>a</sup>                     |
| Cr-MOF     | 0.85±0.05 <sup>c</sup>             | 12.62 ±0.31 <sup>g</sup>                  | 3.25±0.04 <sup>f</sup>                     | 0.41±0.00 <sup>e</sup>                     |
| Al-MOF     | 0.64 ±0.02 <sup>d</sup>            | 13.84 ±1.24 <sup>e</sup>                  | 3.56±0.07 <sup>d</sup>                     | 0.58±0.00 <sup>c</sup>                     |
| Zn-MOF     | 0.90±0.00 <sup>b</sup>             | 14.41 ±0.25 <sup>d</sup>                  | 3.48±0.08 <sup>e</sup>                     | 0.57±0.00 <sup>c</sup>                     |
| Mg-MOF     | 0.97±0.05 <sup>a</sup>             | 13.10 ±0.14 <sup>f</sup>                  | 3.62±0.10 <sup>c</sup>                     | 0.50±0.00 <sup>d</sup>                     |
| HKUST-MOF  | 0.90±0.00 <sup>b</sup>             | 26.31 ±0.45 <sup>a</sup>                  | 3.91±0.05 <sup>a</sup>                     | 0.66±0.00 <sup>b</sup>                     |
| MIL-53-MOF | 1.05±0.05 <sup>a</sup>             | 16.28 ±0.58 <sup>c</sup>                  | 3.92±0.07 <sup>a</sup>                     | 0.55±0.00 <sup>c</sup>                     |

\*Small uppercase letters indicate the statistically significant differences within each column for the mean±SD values calculated from four determinations by one-way ANOVA and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ).

In literature, there are some studies with selected MOFs to purify crude vegetable oils. In an early one (Li et al., 2014), some herbicides from soy, sunflower, corn and peanut oils were adsorbed by MIL-101 MOF, and successfully removed. In another one (Vlasova et al., 2016), MIL-53 (Al), Zn-MOF and MIL-125 (Ti) MOFs were used to remove FFA, peroxides, and color pigments from crude vegetable oils, and some success were achieved. In one of our study (Yılmaz et al., 2019), seven different MOFs were used to purify crude sunflower oil, and Ti-MOF and γ-CD-MOF have shown to be quite effective. The difference of this study from our previous study is that we included the HKUST-MOF, and MIL-53-MOF first time for this purpose in addition to the potentially good MOFs studied before to get a comparison. Theoretically there are many types of MOFs could be synthesized, but we select non-toxic and potentially safe candidates applicable in food processing. After evaluating all data in the MOF group, we selected the Ti-MOF to be included in further comparisons.

#### Comparison of the Selected Adsorbents with Commercial Bleaching Earths

Montmorillonite from the natural clays group, Halloysite-AA from the acid-activated natural clays group, Dowex from the synthetic adsorbents group, and Ti-MOF from the metal-organic frameworks group were selected based on their bleaching performance, and they were compared with two different commercial bleaching earths (C.B.E.-I and C.B.E.-II) in another set of experiment. The findings of this comparison study were presented in Table 5. Halloysite-AA brightened the oil most with 34.76 L value compared to 30.28 L value of the control. It was even higher than the C.B.E.-I which had a 33.35 L value. This indicates a certain potential of Halloysite-AA. Similarly, the lowest – b\* value (-1.13) was measured for Halloysite-AA treated sample, indicating that some green pigments were removed. Contrarily, Dowex treated sample had the highest –a\* value (-2.03) showing that the level of greenness enhanced or the level of red color reduced significantly to get green pigment

more measurable. Yellow color decreased most with C.B.E.-II treated sample (3.20), followed by Halloysite-AA treated (3.88) sample. Clearly Halloysite-AA had certain potential to remove yellow pigments as well. Oil weight loss values

were varied, and the lowest (11.88%) was with Dowex treatment followed by Halloysite-AA (12.08%) treated sample. Both were lower than the commercial bleaching earths to again indicate certain potentials.

Table 5. The color and weight loss values, and chemical parameters measured for the oil samples treated with the commercial bleaching earths and the selected adsorbents.

|                 | L Value                            | a* Value                                   | b* Value                                   | Weight Loss (%)                            |
|-----------------|------------------------------------|--|--|--|
| Control         | 30.28±0.44 <sup>c*</sup>           | -1.35±0.07 <sup>c</sup>                    | 6.23±0.27 <sup>b</sup>                     | –  |
| C.B.E.-I        | 33.35±0.55 <sup>b</sup>            | -1.26±0.02 <sup>d</sup>                    | 4.16±0.36 <sup>c</sup>                     | 14.24±0.16 <sup>c</sup>                    |
| C.B.E.-II       | 32.79±0.37 <sup>b</sup>            | -1.09±0.11 <sup>e</sup>                    | 3.20±0.27 <sup>d</sup>                     | 14.95±0.10 <sup>c</sup>                    |
| Montmorillonite | 28.30±1.11 <sup>d</sup>            | -1.76±0.15 <sup>b</sup>                    | 7.97±0.76 <sup>a</sup>                     | 18.19±0.15 <sup>a</sup>                    |
| Halloysite-AA   | 34.76±1.44 <sup>a</sup>            | -1.13 ±0.07 <sup>e</sup>                   | 3.88±0.18 <sup>c</sup>                     | 12.08±0.21 <sup>d</sup>                    |
| Dowex           | 32.28±0.20 <sup>b</sup>            | -2.03±0.07 <sup>a</sup>                    | 8.44±0.38 <sup>a</sup>                     | 11.88±0.19 <sup>e</sup>                    |
| Ti-MOF          | 29.59±0.67 <sup>d</sup>            | -1.35±0.04 <sup>c</sup>                    | 5.79±0.38 <sup>b</sup>                     | 16.08±0.80 <sup>b</sup>                    |
|                 | Free Fatty Acidity<br>(% Linoleic) | Peroxide Value<br>(meq O <sub>2</sub> /kg) | Specific<br>Extinction (K <sub>232</sub> ) | Specific Extinction<br>(K <sub>270</sub> ) |
| Control         | 1.01±0.00 <sup>at</sup>            | 17.73±0.20 <sup>b</sup>                    | 2.49±0.00 <sup>g</sup>                     | 0.41±0.00 <sup>f</sup>                     |
| C.B.E.-I        | 0.76±0.03 <sup>d</sup>             | 7.94±0.52 <sup>f</sup>                     | 3.76±0.05 <sup>c</sup>                     | 2.68±0.00 <sup>a</sup>                     |
| C.B.E.-II       | 0.85±0.04 <sup>b</sup>             | 10.19±0.37 <sup>d</sup>                    | 3.56±0.00 <sup>d</sup>                     | 2.27±0.00 <sup>b</sup>                     |
| Montmorillonite | 0.44±0.01 <sup>e</sup>             | 19.38±0.35 <sup>a</sup>                    | 3.02±0.02 <sup>f</sup>                     | 0.31±0.00 <sup>g</sup>                     |
| Halloysite-AA   | 0.92±0.00 <sup>b</sup>             | 7.83±0.35 <sup>e</sup>                     | 3.99±0.00 <sup>a</sup>                     | 1.68±0.00 <sup>c</sup>                     |
| Dowex           | 0.80±0.00 <sup>c</sup>             | 8.47±0.33 <sup>e</sup>                     | 3.98±0.00 <sup>b</sup>                     | 0.49±0.00 <sup>e</sup>                     |
| Ti-MOF          | 0.68±0.01 <sup>d</sup>             | 12.50±0.16 <sup>c</sup>                    | 3.28±0.02 <sup>e</sup>                     | 0.55±0.00 <sup>d</sup>                     |

\*Small uppercase letters indicate the statistically significant differences within each column for the mean±SD values calculated from four determinations by one-way ANOVA and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). C.B.E.: commercial bleaching earth

FFA reduction capacity of montmorillonite treated sample (0.44%) was the best among all, and followed by Ti-MOF treated (0.68%) sample. Halloysite-AA treated sample had higher FFA (0.92%) among all samples. The lowest PV was with halloysite-AA treated sample (7.83 meq O<sub>2</sub>/kg), followed by C.B.E.-I (7.94 meq O<sub>2</sub>/kg), and Dowex (8.47 meq O<sub>2</sub>/kg), respectively. The specific extinction values indicated some enhancement to prove that some secondary oxidation took place during the treatments, and precautions suggested as previously.

Comparison of the 4 selected adsorbents with the commercial bleaching earth under the same conditions proved that Halloysite-AA and Dowex had certain potentials to be improved for oil bleaching applications.

#### Comparison of the Adsorbent Mixture with Commercial Bleaching Earths

To compare the commercial bleaching earths (C.B.E.s) with the adsorbent mixture we prepared by mixing equal proportions of natural montmorillonite, halloysite-AA, Dowex, and Ti-MOF, the same experiments were completed and the results are collected in Table 6. The purpose was to include individual beneficial effects of the 4 selected adsorbents together, and to compare it with the C.B.E.s. The L value of adsorbent mixture was the lowest (27.99), unfortunately. Clearly this mixture enhanced some turbidity components (Figure 6). This might also be due to inefficient filtering of the small particles present in the mixture. Obviously C.B.E.-I yielded the most bright sample. While C.B.E.s reduced  $-a^*$  value compared to control (-1.35), the adsorbent mixture enhanced it to -1.41 value. Clearly after adsorbent mixture treatment, level of greenness

enhanced. This could be due to some removal of red pigments, since  $a^*$  value indicates the proportional changes of redness and greenness. Similar trend was evident with the  $b^*$  values, and adsorbent mixture treatment resulted significantly higher (6.04)  $b^*$  value than others (3.75 and 3.03). Since  $+b^*$  value indicate level of yellowness, clearly adsorbent mixture was ineffective in removing yellow pigments. Overall, adsorbent mixture was not as good as the C.B.E.s in correcting oil color values. The oil loss value of

the adsorbent mixture was also the highest among all, showing another negative aspect of it. The FFA value and PV of the adsorbent mixture were lower than the C.B.E.s, indicating that the mixture was more effective in removing free fatty acids and peroxides from the oil. Specific extinction values were also proved this finding (Table 6). Obviously, the adsorbent mixture was not worked as expected to be better an adsorbent for bleaching than the commercial earths.

Table 6. The color and weight loss values, and chemical parameters measured for the oil samples treated with the prepared adsorbent mixture and commercial bleaching earths.

|                   | L Value                            | $a^*$ Value                                     | $b^*$ Value                          | Weight Loss (%)                      |
|-------------------|------------------------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Control           | $30.28 \pm 0.44^{b*}$              | $-1.35 \pm 0.07^a$                              | $6.23 \pm 0.27^a$                    | —                                    |
| Adsorbent Mixture | $27.99 \pm 0.05^d$                 | $-1.41 \pm 0.03^a$                              | $6.04 \pm 0.09^a$                    | $18.49 \pm 0.12^a$                   |
| C.B.E.-I          | $33.07 \pm 0.11^a$                 | $-1.22 \pm 0.00^b$                              | $3.75 \pm 0.03^b$                    | $14.29 \pm 0.13^c$                   |
| C.B.E.-II         | $30.11 \pm 0.02^c$                 | $-1.02 \pm 0.00^c$                              | $3.03 \pm 0.01^c$                    | $15.74 \pm 0.03^b$                   |
|                   | Free Fatty Acidity<br>(% Linoleic) | Peroxide Value<br>( $\text{meqO}_2/\text{kg}$ ) | Specific<br>Extinction ( $K_{232}$ ) | Specific<br>Extinction ( $K_{270}$ ) |
| Control           | $1.01 \pm 0.00^{a*}$               | $17.73 \pm 0.20^d$                              | $2.49 \pm 0.00^d$                    | $0.41 \pm 0.00^d$                    |
| Adsorbent Mixture | $0.92 \pm 0.00^c$                  | $18.33 \pm 0.17^c$                              | $3.36 \pm 0.01^c$                    | $0.57 \pm 0.02^c$                    |
| C.B.E.-I          | $0.94 \pm 0.03^b$                  | $20.1 \pm 0.18^b$                               | $3.88 \pm 0.02^a$                    | $2.56 \pm 0.02^a$                    |
| C.B.E.-II         | $1.02 \pm 0.01^a$                  | $23.43 \pm 0.17^a$                              | $3.67 \pm 0.02^b$                    | $2.26 \pm 0.01^b$                    |

\*Small uppercase letters indicate the statistically significant differences within each column for the mean  $\pm$  SD values calculated from four determinations by one-way ANOVA and Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). C.B.E.: commercial bleaching earth

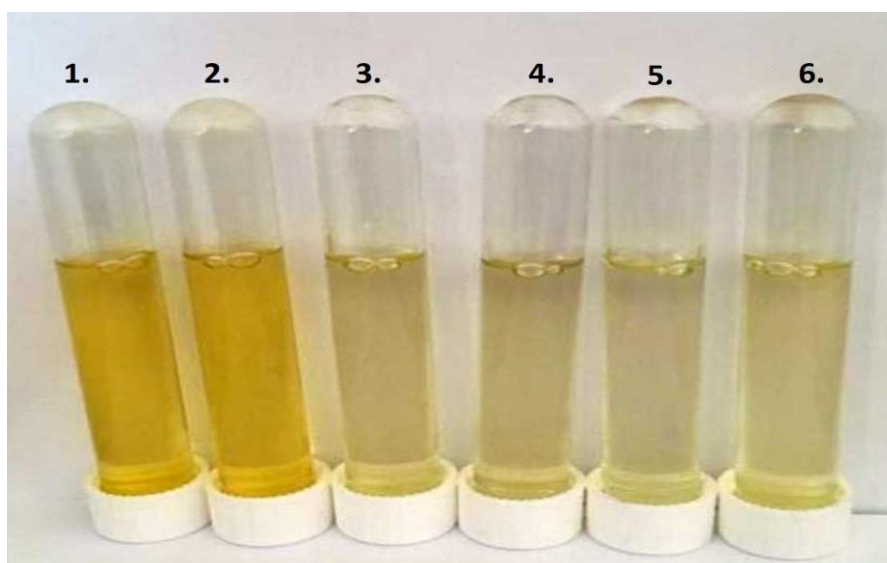


Figure 6. The oil samples treated with adsorbent mixture and commercial bleaching earths (1. Adsorbent mixture-I, 2. Adsorbent mixture -II, 3. C.B.E.-I-1, 4. C.B.E.-I-2, 5. C.B.E.-II-1, 6. C.B.E.-II-2).

## CONCLUSIONS

The aims of this study were to screen and select some potential adsorbent materials for oil bleaching activity. There were four main groups tested. In the first group, 6 different natural clays were screened after adsorbent treatment and oil color, weight loss, FFA, PV, and specific extinctions measurements. Natural montmorillonite was elected the best one among the six clays. In the second group, the same six natural clays were acid-activated and tested in the same way. From this group, acid-activated halloysite yielded the most promising results. In the third group, 10 synthetic adsorbent materials were tested, and Dowex was selected based on its performance. Lastly, 8 different metal-organic frameworks (MOF) were screened and Ti-MOF was chosen. Then, the selected 4 potential adsorbents (natural montmorillonite, halloysite-AA, Dowex, and Ti-MOF) were tested against two commercial bleaching earths (C.B.E.) under the same condition to possibly observe their potential oil bleaching ability. Acid-activated halloysite and Dowex had certain potential to be enhanced with further studies. In the last part of this study, an adsorbent mixture of the selected 4 adsorbents with equal proportions were prepared and tested against the C.B.E.s. Unfortunately, this mixture was not yielded better results. Consequently, mixing selected adsorbents could not produced a better new adsorbents. The literature is lack for halloysite for oil bleaching studies, and this study firstly put this potential to be further studied. Different modification techniques, or acid-activations with different acids at various concentrations and durations must be searched to improve oil bleaching capacity of halloysite. Further, Dowex could be studied for the same purpose in upcoming studies. Although Ti-MOF was selected among the 8 materials, more new MOFs could be synthesized and tested for this purpose, as an open research challenge. More researches are expected to find out or to create new adsorbent materials for optimum crude vegetable oil bleaching.

**CONFLICT OF INTERESTS:** The author declares that for this article they have no actual, potential, or perceived conflict of interests.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Manuscript writing: Emin Yılmaz, planning the experiments: Emin Yılmaz and Elif Yücepete, laboratory experiments: Elif Yücepete, the idea of the study: Emin Yılmaz, designing the study: Emin Yılmaz, editing original draft: Emin Yılmaz. All authors have read and approved the final manuscript.

## REFERENCES

- Anderson, D. (1996). *A Primer on oils processing technology*. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edited by Y.H. Hui, Wiley-Interscience Pub., New York, USA, pp. 1-60.
- AOCS (1998). *Official Methods and Recommended Practice of the American Oil Chemist's Society* (5th ed.). Champaign, IL, USA: American Oil Chemist's Society.
- Boki, K., Kubo, M., Wada, T., Tamura, T. (1992). Bleaching of alkali-refined vegetable oils with clay minerals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69: 232-236. <https://doi.org/10.1007/BF02635892>
- Bu, F., Lin, Q., Zhai, Q., Wang, L., Wu, T., Zheng, S-T., Bu, X., Feng, P. (2012). Two zeolite-type frameworks in one metal-organic framework with Zn<sub>24</sub>@Zn<sub>104</sub> cube-in-sodalite architecture. *Angewandte Chemie International Edition*, 51: 8538-8541. <https://doi.org/10.1002/anie.201203425>
- Didi, M.A., Makhoukhi, B., Azzouz, A., Villemin, D. (2009). Colza oil bleaching through optimized acid activation of bentonite. A comparative study. *Applied Clay Science*, 42: 336-344. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.03.014>
- Gil, B., Kim, M., Kim, J.H., Yoon, S.H. (2014). Comparative study of soybean oil refining using rice hull silicate and commercial adsorbents. *Food Science and Biotechnology*, 23: 1025-1028. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0139-8>
- Hodgson, A. S. (1996). *Refining and bleaching*. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edited by

- Y.H. Hui, Wiley-Interscience Pub., New York, USA, pp. 157-212.
- Jamal, Y., Boulanger, B.O. (2010). Separation of oleic acid from soybean oil using mixed-bed resins. *Journal of Chemical Engineering Data*, 55: 2405-2409. <https://doi.org/10.1021/jc900829c>
- Li, N., Wang, Z., Zhang, L., Nian, L., Lei, L., Ynag, X. (2014). Liquid-phase extraction coupled with metal-organic frameworks-based dispersive solid phase extraction of herbicides in peanuts. *Talanta*, 128: 345-353. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.04.084
- Ma, Y., Lin, J., Xue, Y., Li, J., Huang, Y., Tang C. (2014). Acid-assisted hydro thermal synthesis and adsorption properties of high-specific-surface metal-organic frameworks. *Material Letters*, 132: 90-93. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.06.025>
- Minitab (2010). Minitab Statistical Software (Version 16.1.1). Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA.
- Mishra, P., Kar, R. (2003). Treatment of grapefruit juice for bitterness removal by amberlite ir120 and amberlite ir 400 and alginate entrapped naringinase enzyme. *Journal of Food Science*, 68: 1229-1233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09630.x>
- Naeimi, S., Faghihian, H. (2017). Performance of novel adsorbent prepared by magnetic metal-organic framework (MOF) modified by potassium nickel hexacyanoferrate for removal of Cs<sup>±</sup> from aqueous solution. *Separation and Purification Technology*, 175: 255-265. DOI:10.1016/j.seppur.2016.11.028
- O'Brien, R. D. (2004). *Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications*. CRC Press, Boca Raton, USA, 680 pp.
- Pomeranz, Y. and Meloan, C.E. (1994). *Food Analysis: Theory and Practice*. Chapman and Hall, New York, USA, 778 pp.
- Pu, M., Guan, Z., Ma, Y., Wan, J., Wang, Y., Brusseau, M. L., Chi, H. (2018). Synthesis of iron-based metal-organic framework MIL-53 as an efficient catalyst to activate persulfate for the degradation of Orange G in aqueous solution. *Applied Catalysis A: General*, 549: 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2017.09.021>
- Ribeiro, M.H.L., Silveira, D., Ferreira-Dias, S. (2002). Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents. *European Food Research and Technology*, 215: 462–471. DOI:10.1007/s00217-002-0592-0
- Sabah, E., Çinar, M., Çelik, M. S. (2007). Decolorization of vegetable oils: Adsorption mechanism of  $\beta$ -carotene on acid-activated sepiolite. *Food Chemistry*, 100: 1661-1668. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.12.052
- Samonin, V.V., Spiridonova, E.A., Zotov, A.S., Podvyaznikov, M.L., Garabanzhiu, A.V. (2012). Chemical structure, porous morphology, and sorption properties of adsorbents produced from organic technogenic substrates (a review). *Russian Journal of General Chemistry*, 91: 1546-1565. DOI:10.1134/S107036322108017X
- Smaldone, R.A., Fogan, R.S., Furukawa, H., Gassemith, J.J., Slawin, A.M.Z., Yaghi, O.M. (2010). Metal-organic frameworks from edible natural products. *Angewandte Chemie International Edition*, 49: 8630. <https://doi.org/10.1002/anie.201002343>
- Spanopoulos, I., Bratsos, I., Tampaxis, C., Kourtellaris, A., Tasiopoulos, A., Charalambopoulou, G., Steriotis, T. A., Trikalitis, P. N. (2015). Enhanced gas-sorption properties of a high surface area, ultra micro porous magnesium formate. *CrystEngComm*, 17: 532-539. <https://doi.org/10.1039/C4CE01667J>
- Srimiati, M., Kusharto, C.M., Tanzihah, I., Suseno, S.H. (2015). Effect of different bleaching temperatures on the quality of refined catfish (*Clarias gariepinus*) oil. *Procedia Food Science*, 3: 223-230. DOI:10.1016/j.profoo.2015.01.025
- TGK (2012). Codex for vegetable oils (Codex No: 2012/29). Ministry of Agriculture, Ankara, Türkiye.
- TGK (2017). Turkish Food Codex for olive oil and olive pomace oil (Codex No: 2017/26). Ministry of Agriculture, Ankara, Türkiye.

- Vlasova, E.A., Yakimov, S.A., Naidenko, E.V., Kudrik, E.V., Makarov, S.V. (2016). Application of metal-organic frameworks for purification of vegetable oils. *Food Chemistry*, 190: 103-109. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.078
- 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. DOI:10.1007/s11746-011-1872-2
- 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: 25–38.
- Zhang, A., Du, G., Xiao, Z., Li, C. (2018). Study on optimization of tung oil bleaching and refining process using response surface methodology. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 153: 022032. DOI:10.1088/1755-1315/153/2/022032
- Zschau, W. (2001). Bleaching of edible fats and oils. Cooperative work of the German Society for Fat Science (DGF) by the Study Group. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103: 505-551. DOI:10.1002/1438-9312(200108)103:8<505::AID-EJLT505>3.0.CO;2-7



## INVESTIGATION OF UTILIZING WHEY IN DAIRY-BASED DESSERT FORMULATIONS WITH CAROB POWDER

Tuba ŞANLI\*

Ankara University, Agricultural Faculty, Department of Dairy Technology, Ankara, Turkey

Received / Geliş: 19.01.2023; Accepted / Kabul: 27.04.2023; Published online / Online baskı: 08.06.2023

Şanlı T. (2023). Investigation of utilizing whey in dairy-based dessert formulations with carob powder. GIDA (2023) 48 (3) 670-681 doi: 10.15237/gida.GD23015

Şanlı, T. (2023). Keçi boynuzu tozu içeren süt esaslı tatlı formülasyonlarında peyniraltı suyu kullanımının araştırılması. GIDA (2023) 48 (3) 670-681 doi: 10.15237/gida. GD23015

### ABSTRACT

The objective of this study is to develop a dairy dessert produced with whey at different ratios and carob powder (5%). Five dessert samples prepared by different milk: whey (v/v) ratios were as follows: 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100. Dessert samples were analyzed in terms of some physiochemical, color, textural and sensory properties on the 1st, 7th and 14th days of storage. It was determined that the use of whey significantly affected the titratable acidity, water holding capacity, color parameters ( $L^*$ ,  $b^*$  and  $\Delta E$  values) and textural qualities of the milk dessert samples produced by adding carob powder. Significant differences were also observed in terms of sensory characteristics. As a result of the evaluations, the C sample, which was produced at 50% milk and 50% whey ratios, received the highest scores by the panelists compared to the other samples and became the most liked sample. According to the results obtained, it was determined that the use of whey in milk-based dessert formulations produced with the addition of carob powder contributed positively to the product in terms of sensory and physical properties.

**Keywords:** Dairy dessert, whey, carob powder, functional food

### KEÇİ BOYNUZU TOZU İÇEREN SÜT ESASLI TATLI FORMÜLASYONLARINDA PEYNİRALTI SUYU KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, farklı oranlarda peynir altı suyu ve keçi boynuzu tozu (%5) ilavesi ile üretilen bir sütlü tatlı geliştirmektir. Süt:peynir altı suyu (v/v) oranları 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 ve 0:100 olacak şekilde beş tatlı örneği üretilmiştir. Tatlı örnekleri fizikokimyasal, renk, tekstür ve duyuşal özellikler açısından depolamanın 1., 7. ve 14. günlerinde analiz edilmiştir. Peynir altı suyu kullanımının keçi boynuzu tozu ilave edilerek üretilen sütlü tatlı örneklerinin titre edilebilir asitlik, su tutma kapasitesi, renk parametreleri ( $L^*$ ,  $b^*$  ve  $\Delta E$  değerleri) ve tekstürel niteliklerini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Duyuşal özellikler açısından da önemli farklılıklar gözlenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, %50 süt ve %50 peynir altı suyu oranlarında üretilen C örneği, diğer örneklerle kıyasla panelistler tarafından en yüksek puanları alarak en beğenilen örnek olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, keçi boynuzu tozu ilavesi ile üretilen süt esaslı tatlı formülasyonlarında peynir altı suyunun kullanımının ürüne duyuşal ve fiziksel özellikler açısından olumlu katkı sağladığı belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Sütlü tatlı, peyniraltı suyu, keçi boynuzu tozu, fonksiyonel gıda

\* Corresponding author /Yazışmalardan sorumlu yazar

✉: tcetin@agri.ankara.edu.tr

☎: (+90) 312 596 1527

Tuba Şanlı; ORCID no: 0000-0001-6747-2617

## INTRODUCTION

Nowadays, an increasing interest exists for food enrichment in ways that providing health benefits to the consumers (Zarzycki et al., 2019). These products are known as functional foods promising improvement in consumers' targeted physiological functions (Sun et al., 2007; Almeida Neta et al., 2018). In this regard, dairy-based desserts, with worldwide consumption capacity, can be a good option for consumers interested in functional foods (Damian, 2012; Zarzycki et al., 2019) in day by day growing dessert market with new products (Granato et al., 2012; Barros et al., 2017).

Dairy desserts are usually formulated with milk, sugar, starch, hydrocolloids, aroma and coloring agents. They are semisolid foods and the texture of them mainly results from between interaction of proteins and other ingredients such as starch and/or several hydrocolloids. These interactions contribute to their physical stability and sensory properties. Therefore, it is necessary to obtain a balance between ingredients in these formulated products to improve textural properties and to ensure consumer acceptability (Tárrega and Costell, 2007; Damian, 2012; Staffolo et al., 2017; Zarzycki et al., 2019). However, adding different ingredients to the basic formulation of dairy desserts could also lead to positive changes in the rheological and textural properties of the products (Zarzycki et al., 2019). The effects of the different ingredients used in dairy dessert has been the subject of several studies (Granato et al., 2012; Staffolo et al., 2017; Almeida Neta et al., 2018; Innova et al., 2018).

Whey, a by-product from cheese manufacture is considered as functional ingredient for food industry because of its valuable composition. Two main whey varieties produced are sweet and acid whey according to the procedure used for casein precipitation. Sweet whey (pH 5.8–6.6) is a by-product of rennet-induced coagulation of casein, whereas acid whey (pH 3.6–5.1) is obtained from acid coagulation of casein (Królczyk et al., 2016). Further to their nutritional contribution, it can improve the quality properties of whey-based products (Evdokimov et al., 2015). Whey

components, particularly the proteins and peptides, will increasingly be preferred as ingredients for functional foods. In recent years, studies on the use of whey in food system have attracted attention (Sabokbar and Khodaiyan, 2015; Evdokimov et al., 2015).

Carob is the fruit of long-lived evergreen tree (*Crotonia siliqua* L.), which is cultivated in Mediterranean regions (Srouf et al., 2016; Moreira et al., 2017). It is composed of two major part, pulp (90%) and seed (20%). The seeds are used to produce the carob bean gum which is widely used as stabilizer in food industry. Carob can be processed into powder and syrup for food applications. After the removal of seeds carob pulp is processed to obtain carob powder (Srouf et al., 2016; Yatmaz and Turhan, 2018). The pulp contains high amounts of protein (3-4%) and low levels of fat (0.2-0.6%) (Şahin et al., 2009; Ibrahim et al., 2015). Due to its high sugar content (40-55%), limited amount of sugar is required in products where carob pulp is used (Loullis and Pinakoulaki, 2018). In addition, it contains considerable amount of dietetic fibers (Srouf et al., 2016; Moreira et al., 2017). Carob has several beneficial effects on health, such as cholesterol-lowering, antibacterial and antioxidant properties. Recently, researchers are focused on its utilization as a valuable ingredient in production of different foods (Ibrahim et al., 2015; Rosa et al., 2015; Srouf et al., 2016; Aydın and Ozdemir, 2017; Moreira et al., 2017; Villarreal 2017; Červenka, et al., 2019). However, there is limited literature concerning the formulating dairy dessert containing carob.

The aim of this study was to investigate the combined effects of whey utilization and carob powder use in dairy dessert formulation, besides that to observe the physicochemical, textural and sensorial effects of using these nutritious compounds in dairy-based dessert formulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Ingredients and whey-based dairy dessert preparation

Sugar, tapioca starch, vanillin and carob fruit were obtained from local market. Carrageenan was



supplied by CoPkelco (A Huber Company, Denmark). Raw milk (total solid 8%, fat 0.5%, protein 3.5%, ash 0.6% and 6.8 pH) and rennet-whey (total solid 6%, fat 0.1%, protein 0.8%, ash 0.7% and 5.7 pH) was used for the production of whey-based dairy dessert. Carob powder was obtained from the dry fruit pod after the removal of the seeds (Figure 1). Pods were milled using laboratory type mill (Mateka, Mutbex.com, Turkey) and stored at room temperature until use. Dessert samples formulated by mixing different ratios of milk and whey (v/v) were given in Table 1. The amounts of compounds exist in dessert formulations were determined by preliminary studies that got acceptable sensory scores were

given as follows: sugar (3%, w/v), starch (4%, w/v), carrageenan (0.2%, w/v), vanillin (0.03%, w/v) and carob powder (5%, w/v). First, all ingredients were weighed, according to formulation and were mixed thoroughly with the required milk and whey ratio by using blender. Subsequently, the mixture was heated up to 85 °C, kept for 15 min by stirring on a laboratory water bath and all samples (A, B, C, D, and E) were allowed to cool until reaching room temperature. After that, 100 g desserts were put into individual plastic cups, closed with cap to prevent drying and were stored at refrigerated conditions ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) for 14 days. Appearance of the samples were given in Figure 2.

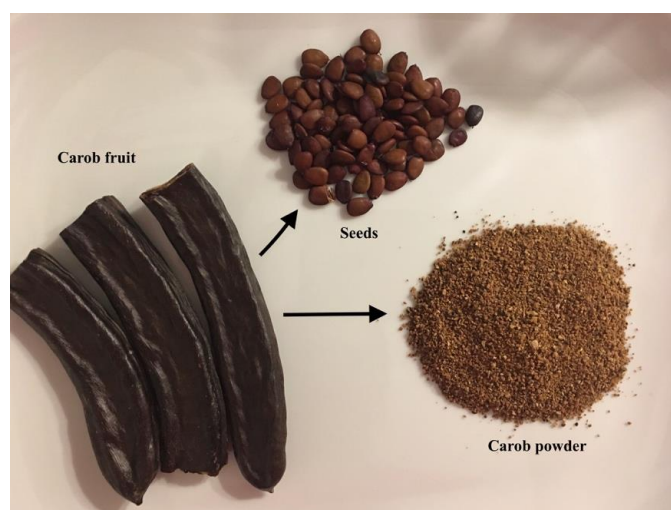


Figure 1. Carob fruit, seeds and carob powder

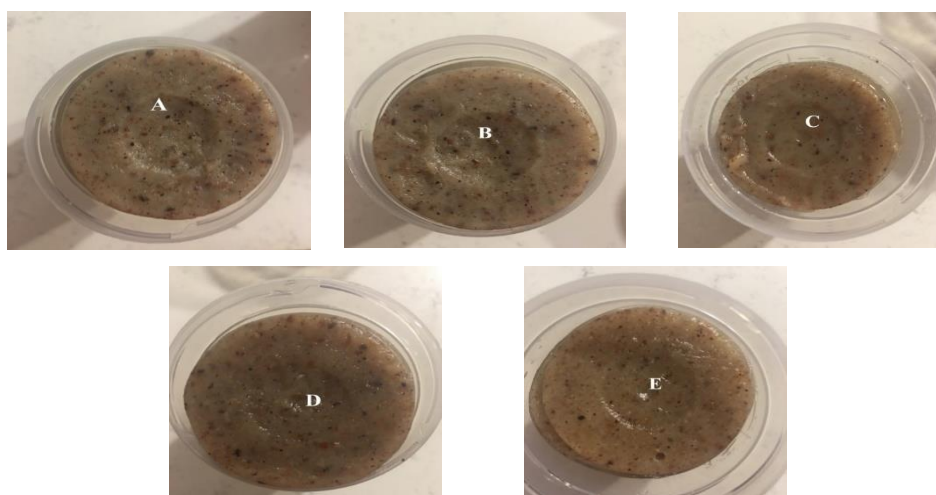


Figure 2. Appearance of carob powder added dairy-based dessert samples with different milk:whey ratios

Table 1 Dessert samples with different milk and whey ratios

| Sample code | Milk (%v/v) | Whey (%v/v) |
|-------------|-------------|-------------|
| A (control) | 100         | -           |
| B           | 75          | 25          |
| C           | 50          | 50          |
| D           | 25          | 75          |
| E           | -           | 100         |

### Physiochemical analyses

The fat, titratable acidity, total solids and ash contents of the whey-based dairy desserts were determined according to the methods reported by Hooi et al., (2004). pH values were measured by digital pH meter (Ohaus, ST 300, USA). The protein content was calculated using the conversion factor 6.38, from the analysis of total nitrogen contents by the Kjeldahl method as described in the IDF Standard 20B (IDF, 1993). The water holding capacity (WHC) of the samples was measured by weighing about 20 g of dessert (DE) into cylindrical plastic tube and centrifugation (SIGMA Model 3-18K, Osterode am Harz, Germany) at 4°C for 40 min at 5000 rpm. After centrifuged the whey expelled (WE) was carefully removed and weighed. The WHC, % was calculated according to following Equation (1). The WHC was determined in duplicate from independent samples (Granto et al., 2012).

$$\text{WHC (\%)} = 100 [(DE - WE)/DE] \quad (1)$$

### Texture analysis

Textural properties of samples were determined by using back extrusion test by Texture Analyzer TA-XT Plus (Stable Micro Systems, UK) with 5 kg load cell (Almedia Neta et al., 2018). Compression test was applied by using 35 mm disc (A/BE-d35, Stable Micro Systems, UK) on approximately 100 g samples in plastic cups. The parameters firmness, consistency, cohesiveness and viscosity index were recorded using Exponent software (Version 6.1.16.0, Stable Micro Systems). During the analysis, penetration distance, penetration speed and return speed were applied 30 mm, 1 mm/s and 10 mm/s, respectively. All determinations were carried out in triplicate.

### Sensory evaluation

Sensory evaluation was performed by hedonic 5-point scale changing in “I dislike extremely” to “I like extremely and centered “neither like nor dislike” scale with a trained group of 10 panelists (Altug-Onogur and Elmacı, 2015). The panelists were selected from staff members and graduate students of Dairy Technological Department (Ankara University). The sensory attributes taken into consideration were color-appearance, flavor, textural, and overall acceptability. Approximately 20 g of each sample was presented to the panelists at refrigeration temperature in odorless plastic cups with three-digit random numbers coded. Water and cracker were provided to each panelists for palate cleansing between samples.

### Color evaluation

Color measurement was performed in the samples by using a colorimeter Konica Minolta (CR 410, Sensing Inc., Osaka, Japan) and was reported as  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (intensity of red to greenness) and  $b^*$  (intensity of yellow to blue) values. In addition, total color differences ( $\Delta E$ ) were calculated using the equation below, where  $L_0$ ,  $a_0$ , and  $b_0$  are the values measured for control (sample A) and used in Equation 2 (Chudy et al., 2020).

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

### Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using Statistical Package for the Social Science (SPSS) software program (SPSS Version 20.0, IBM Corp. Armonk, NY, USA, 2011). All whey-based dairy desserts were manufactured twice. Thus, results are mean  $\pm$  standards deviation (SD) of  $n = 4$ . The two-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effects of factors (sample type and storage time) on the measured parameters. Tukey comparison test was used to determine the statistically significant differences between means.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physiochemical properties

Table 2 shows the mean composition of dessert samples on the 1<sup>st</sup> day of storage. No significant

differences ( $P>0.05$ ) in dry matter and ash contents of whey-based dairy dessert samples were observed. However, there were significant differences ( $P<0.05$ ) in protein contents of the

samples. As expected the protein content in samples A and B were higher than the other samples since they contain higher amount of milk (Table 2).

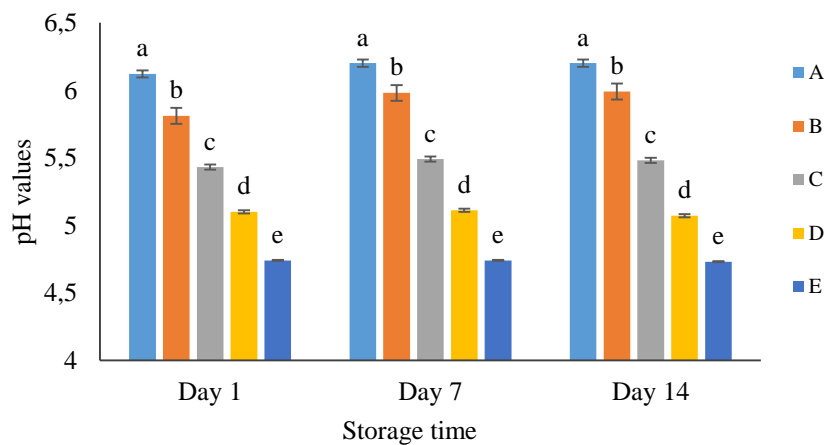
Table 2 Mean composition of whey-based dairy dessert samples

| Parameters (%<br>g/100 g) | Samples                 |                         |                         |                         |                         |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                           | A                       | B                       | C                       | D                       | E                       |
| Dry matter                | 19.65±0.40 <sup>a</sup> | 18.40±1.32 <sup>a</sup> | 19.39±0.78 <sup>a</sup> | 18.01±0.18 <sup>a</sup> | 18.60±0.47 <sup>a</sup> |
| Protein                   | 4.301±0.14 <sup>a</sup> | 3.75±0.07 <sup>a</sup>  | 3.00±0.71 <sup>ab</sup> | 2.11±0.02 <sup>b</sup>  | 1.47±0.46 <sup>b</sup>  |
| Ash                       | 0.99±0.14 <sup>a</sup>  | 0.90±0.12 <sup>a</sup>  | 0.89±0.01 <sup>a</sup>  | 0.93±0.03 <sup>a</sup>  | 0.87±0.01 <sup>a</sup>  |

Lower cases (<sup>a,b</sup>) indicate that the values in the same line differ significant at  $P<0.05$ .

The pH and titratable acidity analysis results for whey-based dairy dessert samples are presented Figure 3. The pH values of dessert samples ranged between 4.74 and 6.12 at day 1 and there was no significant difference ( $P>0.05$ ) in the pH values during 14 days of storage. This indicates that the addition of whey and carob powder results in a stable pH in the dairy dessert samples under refrigerated conditions. However, differences in terms of pH values between whey-based dairy dessert samples were statistically significant ( $P<0.05$ ). Lower pH values were obtained in samples (B, C, D and E) in accordance with added whey level. On the other hand, during the storage

period some changes were observed in the titratable acidity of samples compared to pH values. The presence of exogenous buffer constituents in samples derived from milk and whey can cause the variations in pH were less pronounced than the variations in acidity (Tamime and Deet, 1980). The effect of addition of whey in different ratios and storage time on the titratable acidity values of dairy dessert samples were found to be statistically significant ( $P<0.01$ ). Titratable acidity values of all dessert samples decreased until day 7 but increased at the end of 14 days of storage.



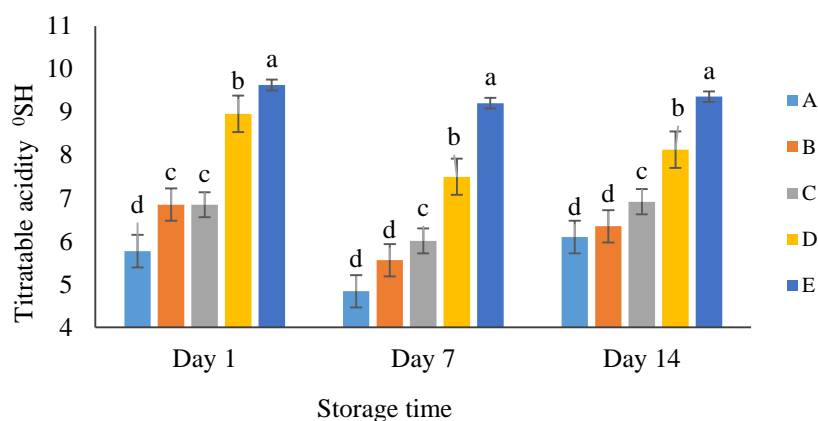


Figure 3. pH and titratable acidity of whey-based dairy dessert samples

Error bars denote standard deviations. Different letters above the bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between dessert samples.

WHC is a useful tool to describe the ability of a food matrix to retain free water (Granato et al., 2012). WHC of the whey-based dairy dessert samples ranged from min 85.89% (sample E) to max 92.42% (sample A). In Figure 4, it is observed that the WHC was negatively affected ( $P < 0.05$ ) by whey addition. The lowest WHC was determined in the E sample, which contains 100% whey with lower acidity. The highest value of WHC was determined in the dessert sample with no whey (sample A). However, WHC values of whey-based dessert samples formulated carob powder were not affected significantly ( $P > 0.001$ ) by the storage time and no significant difference

was observed in sample and storage time interaction ( $P > 0.05$ ). This result may be due to effect of the carob powder which is a rich source of fiber (Srouf et al., 2016; Moreira et al., 2017). It is known that the water absorption and water holding characteristics of fiber in food formulation would not only enhance nutritional value but also improve stability of the food during storage (Loullis and Pinakoulaki, 2018). These results were in agreement with the results obtained by Staffolo et al. (2017) who studied effect of plant fibers on some properties of low-calorie dairy desserts.

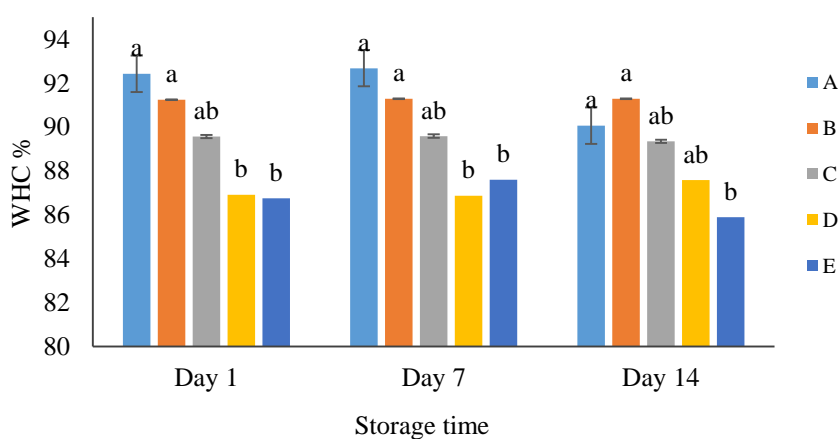


Figure 4. Water holding capacity (WHC) of whey-based dairy dessert samples

Error bars denote standard deviations. Different letters above the bars indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between dessert samples.

### Color evaluation

Color properties have a remarkable influence on consumer acceptance (Chudy et al., 2020). The changes in instrumental color parameters determined using  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values are presented in Table 3. As can be seen,  $L^*$  (lightness) and  $b^*$  (yellow/blueness) values of whey-based dairy dessert samples were significantly different. The highest  $L^*$  value (41.45) was determined in sample A containing 100% milk, while the lowest  $L^*$  value (34.69) was found in sample E 100% whey. Depending on the amount of added whey, B, C, D and E samples exhibited lower  $L^*$  values. Carob powder resulted in darkening effect in color of the samples depending on its original color. The results for  $b^*$  values of dessert samples were ranging from 5.36 to 6.59, which represented a color in the yellow region. The

negative  $a^*$  values of the samples changed between -3.65 and -4.70 were perceived as green. No significant ( $P>0.05$ ) difference was observed among  $a^*$  (red/greenness) values of samples. But use of different whey ratio in the formulation created a significant difference in both  $L^*$  and  $b^*$  values of the samples ( $P<0.05$ ) (Table3). The values of  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  were not affected significantly ( $P>0.05$ ) by the storage time. Consequently, the total color difference ( $\Delta E$ ) for samples was significantly influenced by whey addition and storage time ( $P<0.05$ ). Higher total color difference values ( $\Delta E$ ) were obtained in dessert samples with increasing whey ratios, but samples became less different than control (A) in terms of color; that is  $\Delta E$  decreased from day 1 to day 14 in the samples. (Figure 5).

Table 3 Color parameters of whey-based dairy dessert samples

| Parameters | Storage time (days) | Samples                 |                          |                          |                         |                          | ANOVA      |           |                  |
|------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------|-----------|------------------|
|            |                     | A                       | B                        | C                        | D                       | E                        | $p$ -group | $p$ -time | $p$ -groupX time |
| $L^*$      | 1                   | 41.45±0.14 <sup>a</sup> | 39.69±0.87 <sup>a</sup>  | 37.53±1.05 <sup>b</sup>  | 36.82±0.81 <sup>b</sup> | 34.69±0.66 <sup>c</sup>  | ***        | NS        | NS               |
|            | 7                   | 40.98±0.81 <sup>a</sup> | 39.13±0.35 <sup>a</sup>  | 36.28±0.11 <sup>b</sup>  | 37.81±1.04 <sup>c</sup> | 35.19±1.10 <sup>b</sup>  |            |           |                  |
|            | 14                  | 39.42±1.01 <sup>a</sup> | 38.36±0.57 <sup>ab</sup> | 36.72±1.41 <sup>bc</sup> | 37.34±0.81 <sup>c</sup> | 35.87±1.53 <sup>bc</sup> |            |           |                  |
| $a^*$      | 1                   | -4.49±0.32              | -4.49±0.32               | -4.50±0.49               | -4.38±0.13              | -4.70±0.24               | NS         | NS        | NS               |
|            | 7                   | -3.91±0.48              | -3.91±0.91               | -4.29±0.34               | -4.51±0.21              | -4.39±0.13               |            |           |                  |
|            | 14                  | -3.65±0.28              | -4.25±0.50               | -4.25±0.50               | -4.41±0.23              | -4.35±0.12               |            |           |                  |
| $b^*$      | 1                   | 5.78±0.33 <sup>b</sup>  | 6.01±0.23 <sup>b</sup>   | 6.37±0.11 <sup>a</sup>   | 6.54±0.1 <sup>a</sup>   | 5.36±0.38 <sup>b</sup>   | ***        | NS        | NS               |
|            | 7                   | 6.12±0.35 <sup>a</sup>  | 6.37±0.23 <sup>a</sup>   | 6.01±0.11 <sup>a</sup>   | 6.59±0.0 <sup>a</sup>   | 5.37±0.09 <sup>b</sup>   |            |           |                  |
|            | 14                  | 5.47±0.12 <sup>b</sup>  | 6.09±0.68 <sup>a</sup>   | 5.54±0.25 <sup>b</sup>   | 6.40±0.0 <sup>a</sup>   | 5.49±0.16 <sup>b</sup>   |            |           |                  |

Lower cases (<sup>a,b,c</sup>) indicate that the values in the same line differ significant at  $P<0.05$ .

\*\*\*  $P<0.0001$ , NS: not significant  $P>0.05$ , group: sample, time: storage time, group x time: interaction between sample and storage time

### Texture properties

It is well recognized that the structure of foods greatly affects their textural properties (Almeida Neta et al., 2018). The results for textural parameters of whey-based dairy dessert samples were presented in Table 4. There were significant differences in textural properties between whey-

based dairy desserts ( $P<0.05$ ) Firmness is defined as the force necessary to achieve a given deformation in the product (Rosa et al., 2015). The firmness, consistency and viscosity index values of samples ranged from 2.65 to 6.04 (N), from 66.98 to 149.34 (N x s) and from 1.22 to 2.27 (N x s), respectively. In Table 4, it can be seen that

dessert sample A (100% milk) got the highest values in terms of texture parameters except cohesiveness. Similarly, all texture parameters decreased in the samples associated with amount

Table 4

of whey used. As the amount of whey used in the formulation increased, texture values decreased and a softer structure was obtained in the samples (e.g. sample E with 100% whey).

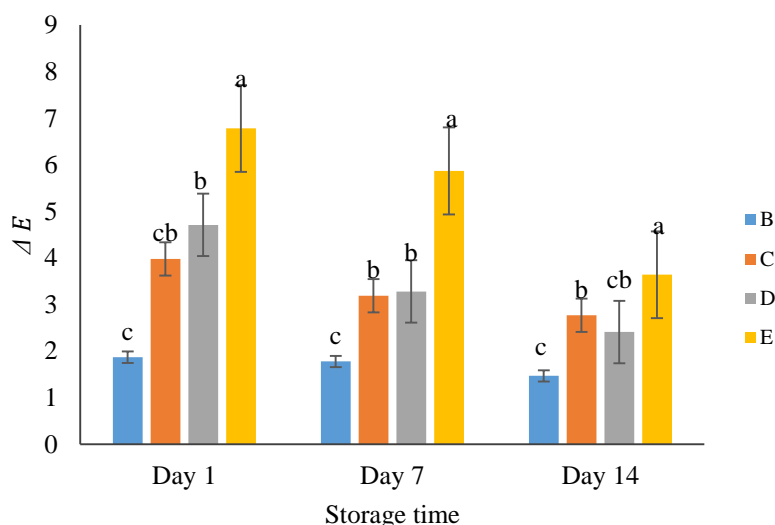


Figure 5. Total color difference values ( $\Delta E$ ) of whey-based dairy dessert samples. Error bars denote standard deviations. Different letters above the bars indicate significant differences ( $P<0.05$ ) between dessert samples.

Table 4 Textural parameters of whey-based dairy dessert samples

| Parameters              | Storage time (days) | Samples                   |                           |                           |                          |                          | ANOVA      |           |                               |
|-------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|-----------|-------------------------------|
|                         |                     | A                         | B                         | C                         | D                        | E                        | $p$ -group | $p$ -time | $p$ -group $\times$ $p$ -time |
| Firmness (N)            | 1                   | 5.50±0.13 <sup>Ba</sup>   | 4.75±0.13 <sup>Cb</sup>   | 3.5±0.14 <sup>Cc</sup>    | 2.81±0.04 <sup>Bd</sup>  | 2.65±0.13 <sup>Bd</sup>  | ***        | ***       | ***                           |
|                         | 7                   | 6.04±0.01 <sup>Aa</sup>   | 5.63±0.09 <sup>Ab</sup>   | 4.3±0.06 <sup>Ac</sup>    | 3.48±0.41 <sup>Ad</sup>  | 3.34±0.06 <sup>Ad</sup>  |            |           |                               |
|                         | 14                  | 4.95±0.04 <sup>Ca</sup>   | 5.20±0.14 <sup>Ba</sup>   | 3.86±0.00 <sup>Bb</sup>   | 3.54±0.14 <sup>Ac</sup>  | 3.29±0.03 <sup>Bc</sup>  |            |           |                               |
| Consistency (N x s)     | 1                   | 134.54±3.52 <sup>Ba</sup> | 115.57±2.09 <sup>Cb</sup> | 96.97±10.51 <sup>Bc</sup> | 70.47±1.43 <sup>Bd</sup> | 68.71±3.14 <sup>Bd</sup> | ***        | ***       | **                            |
|                         | 7                   | 149.34±2.16 <sup>Aa</sup> | 142.38±0.04 <sup>Aa</sup> | 106.77±0.04 <sup>Ab</sup> | 73.79±0.74 <sup>Ac</sup> | 86.20±1.36 <sup>Ad</sup> |            |           |                               |
|                         | 14                  | 126.02±4.74 <sup>Ca</sup> | 129.05±0.76 <sup>Ba</sup> | 92.91±4.56 <sup>Bb</sup>  | 66.98±0.52 <sup>Bc</sup> | 83.84±1.34 <sup>Ad</sup> |            |           |                               |
| Cohesiveness (N)        | 1                   | 1.11±0.02 <sup>A</sup>    | 1.06±0.05                 | 1.11±0.09                 | 1.09±0.01                | 1.11±0.03 <sup>A</sup>   | NS         | *         | NS                            |
|                         | 7                   | 1.12±0.01 <sup>A</sup>    | 1.09±0.04                 | 1.04±0.04                 | 1.08±0.05                | 1.05±0.01 <sup>B</sup>   |            |           |                               |
|                         | 14                  | 1.02±0.01 <sup>B</sup>    | 1.07±0.03                 | 1.06±0.02                 | 1.05±0.01                | 1.04±0.01 <sup>B</sup>   |            |           |                               |
| Viscosity index (N x s) | 1                   | 2.27±0.13 <sup>a</sup>    | 1.97±0.04 <sup>Ab</sup>   | 1.82±0.02 <sup>Ac</sup>   | 1.70±0.03 <sup>Ac</sup>  | 1.65±0.06 <sup>Ac</sup>  | ***        | ***       | *                             |
|                         | 7                   | 2.19±0.01 <sup>a</sup>    | 1.8±0.04 <sup>Bb</sup>    | 1.75±0.06 <sup>Ab</sup>   | 1.67±0.03 <sup>Ac</sup>  | 1.52±0.06 <sup>Bd</sup>  |            |           |                               |
|                         | 14                  | 2.16±0.00 <sup>a</sup>    | 1.79±0.04 <sup>Bb</sup>   | 1.59±0.06 <sup>Bc</sup>   | 1.42±0.02 <sup>Bd</sup>  | 1.22±0.06 <sup>Cc</sup>  |            |           |                               |

Upper cases (<sup>A,B,C</sup>) indicate that the values in the same column differ significant at  $P<0.05$

Lower cases (<sup>a,b,c,d,e</sup>) indicate that the values in the same line differ significant at  $P<0.05$ .

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.001$ , \*\*\*  $P<0.0001$ , NS: not significant  $P>0.05$ , group: sample, time: storage time, group x time: interaction between sample and storage time

Cohesiveness is an important textural property of dairy products and depends on the internal structure of the products. It is defined as ratio of positive force area during the second compression to that during the first compression (Rosa et al., 2015). The cohesiveness of dessert samples determined in this study range from 1.02 to 1.11 (N). Differences in cohesiveness values were not significant ( $P>0.05$ ) between the whey-based dairy dessert samples.

The texture values obtained for carob powder added whey-based desserts were remarkably higher than determined in studies carried out on dairy desserts by Zarzycki et al., (2019), Rosa et al., (2015) and Almeida Neta et al., (2018). It is believed that the difference was related to presence of fiber-rich carob powder in the formulations.

There were significant increases in firmness, consistency and cohesiveness values of all dessert samples on day 7 and decreases were observed significantly at the end of storage. These results were similar those obtained by Almeida Neta et al., (2018) who carried out a study on fermented dessert with whey for 21 day. However, it was found that viscosity index values of all dessert samples were maximum on 1 day and decreased slightly during storage period (Table 4).

### Sensory evaluation

The results of sensory analyses were given in Figure 6. Although, statistical data not shown in the figure; the flavor, color - appearance, textural and general acceptability scores of samples were detected as significantly different statistically ( $P<0.001$ ). Results showed that the flavor scores of dessert samples were significantly affected by storage time ( $P<0.05$ ). Besides that, the interaction between sample type and storage time significantly affected the flavor scores of dessert samples ( $P<0.001$ ). Storage time was not found statistically significant in terms of appearance, textural and overall acceptability characteristics of the samples ( $P>0.05$ ). The highest flavor scores (5 like extremely) were given for sample C (%50 milk and %50 whey) at days 1 and 7 of storage time. On the other hand, for samples C and D slight

decrease were observed in flavor from day 7 to day 14, while there were significant increase in flavor scores of samples A, B, and E ( $P<0.05$ ). Generally, flavor scores of samples A and E were remarkably lower than others (Figure 6).

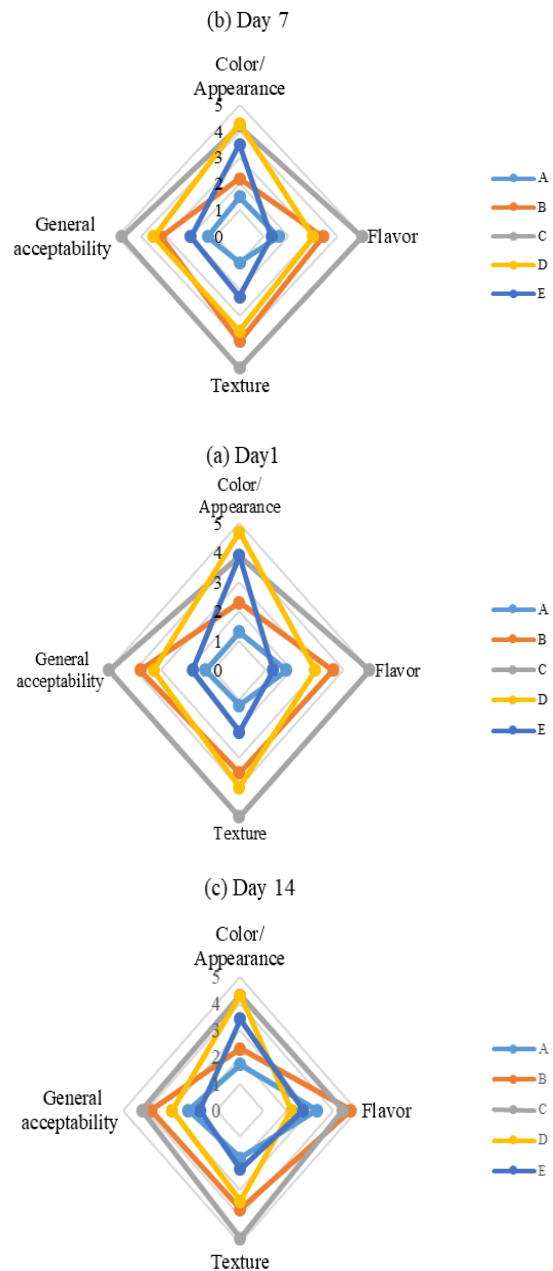


Figure 6. Sensory scores of whey-based dairy dessert samples with carob powder

Color-appearance attributes of sample C (50% milk and 50% whey) and D (25% milk and 75% whey) received higher scores and rated as “like” in 5-point scale. Although highest  $L^*$  (lightness) values were obtained in instrumental color analysis of sample A and sample B containing larger amount of milk (>50%), appearance scores were remarkably lower (Figure 6). This result indicated that darker color in whey-based dairy dessert with carob powder were more appreciated by panelists. The texture scores given for A, B, D and E with different milk and whey ratios (Table 1) were lower than sample C. The lowest texture scores were given for sample A and sample E but the highest and lowest firmness in instrumental texture analysis were also observed for sample A and sample E, respectively. In overall assessment, sample C, whey-based dairy dessert with equal amounts of milk and whey, exhibited better overall acceptability compared to other samples containing more than 50% of whey in the formulation.

## CONCLUSION

This study focused on probability of using whey in dairy dessert production with different ratios together with carob powder and determining the characteristics of desserts during storage period. The use of whey in dairy dessert did not cause difference in mean composition of the product except protein content. Whey use in dessert formulation affected WHC,  $L^*$ ,  $b^*$  and  $\Delta E$  values of dairy dessert samples. However, carob powder use in the formulation was thought to improve WHC of whey-based dairy desserts during storage period. In general, the sensory analysis of whey based dairy with carob powder dessert indicated that sample C (50% milk and 50% whey) was more acceptable for panelists in terms of color-appearance, textural, flavor and overall acceptability. The results of this study demonstrated that, it is possible to use whey in proper ratios in dairy dessert formulations and also carob powder can be a good healthy ingredient alternative for dairy desserts. In further studies, it is valuable to examine the functional properties of the whey-based dairy desserts' characteristics with regarding health effects.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENT

The author did not receive support from any organization for the submitted work.

## REFERENCES

- Almedia Neta M.C, Rocha de Queroga A.P, Jacinto Almeida R.L, Soares A.C, Gonçalves J.M, Fernandes S.S, Cíntia de Sousa M., Olbrich dos Santos K.M, Alonso Buriti F.C, Florentino E.R. (2018). Fermented dessert with whey, ingredients from the peel of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and an indigenous culture of *Lactobacillus plantarum*: Composition, microbial viability, antioxidant capacity and sensory features. *Nutrient*, 10:1214. doi: 10.3390/nu10091214.
- Altug-Onogur T., Elmaci Y. (2015). *Sensory Evaluation in Food*. Sidas Medya, İzmir.
- Aydın S., Ozdemir Y. (2017). Development and characterization of carob flour based functional spread for increasing use as nutritious snack for children. *Journal Food Quality*. Volume 2017, Article ID 5028150, 7 pages. doi: 10.1155/2017/5028150.
- Barros D., Santos Guerreiro J., Pinheiro R. (2017). Shelf-life evaluation of condensed milk-based ready-to-eat dessert: Physicochemical, texture and sensory characteristics. *Food Science Technology*, 5(5): 113-124. doi: 10.13189/fst.2017.050503.
- Červenka L., Frühbauerová M., Velichová H. (2019). Functional properties of muffin as affected by substituting wheat flour with carob powder. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1): 212-217. doi: 10.5219/1033.
- Chudy S., Bilská A., Kowalski R., Teichert J. (2020). Colour of milk and milk products in CIE  $L^*a^*b^*$ space. *Medycyna Weterynaryjna*, 76(2): 77–81. doi: 10.21521/mw.6327.
- Damian C. (2012). Effect of different milk substitutes on rheological properties of puddings. *Food Environment Safety-journal of Food Engineering, Ștefan cel Mare University-Suceava*, 11(3): 62-67.



- Evdokimov I.A., Volodin D.N., Misyura V.A., Zolotoreva M.S., Shramko M.I. (2015). Functional fermented milk desserts based on acid whey. *Foods Raw Materials*, 3(2): 40-48. doi: 10.12737/13116.
- Granato D., Masson M.L., Ribeiro J.C.B. (2012). Sensory acceptability and physical stability evaluation of a prebiotic soy-based dessert developed with passion fruit juice. *Food Science and Technology (Campinas)*, 32(1): 119-126. doi: 10.1590/S0101.
- Hooi R., Barbano D.M., Bradley R.L., Budde D., Bulthaus M., Chettiar M. (2004). *Chemical and physical methods*. In: *Standard methods for the examination of dairy products*, Wehr, H.M., Frank, J.F. (chief eds.), American Public Health Association, Washington, the USA, pp. 363-352.
- Ibrahim S.O., Mohammed T.A., Abd-Elsattar H.H. (2015). Quality characteristics of rice biscuits sweetened with carob powder. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 5(4): 1082-1090.
- IDF (1993). Standard No 20B: Milk determination of nitrogen content. International Dairy Federation, Brussels, Switzerland.
- Innova M., Petkova N., Balabanona T., Ognyanov M., Juices B. (2018). Food Design of dairy desserts with encapsulated cornelian cherry, chokeberry and blackberry juices. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*, 42(1): 137-146.
- Królczyk J.B., Dawidziuk T., Janiszewska-Turak E., Sołowiej B. (2016). Use of whey and whey preparations in the food industry – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 66(3): 157-165.
- Loullis A., Pinakoulaki E. (2018). Carob as cocoa substitute: A review on composition, healthy benefits and food applications. *European Food Research and Technology*, 44: 959-977. doi: 10.1007/s00217-017-3018-8.
- Moreira T.C., Transfeld da Silva A., Fagundes C., Rodrigues S.M., Cândido L.M.B., Passos M., Hecke Krüger C.C. (2017). Elaboration of yoghurt with reduced level of lactose added of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *LWT-Food Science and Technology*, 76: 326-329. doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.033.
- Rosa C.S., Tessele K., Prestes R.C., Silveira M., Franco F. (2015). Effect of substituting of cocoa powder for carob flour in cakes made with soy and banana flours. *International Food Research Journal*, 22(5): 211-2118.
- Sabokbar N., Khodaiyan F. (2015). Characterization of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6): 3711-3718. doi: 10.1007/s13197-014-1412-9.
- Srouf N., Daroub H., Toufeili I., Olabi A. (2016). Developing a carob-based milk beverage using different varieties of carob pods and two roasting treatment and assessing their effect on quality characteristics. *Journal of the Science of food and Agriculture*, 96: 3047-3057. doi: 10.1002/jsfa.7476.
- Staffolo M.D., Sato A.C.K., Cunha R. (2017). Utilization of plant dietary fibers to reinforce low-calorie dairy dessert structure. *Food and Bioprocess Technology*, 10: 14-925. doi: 10.1007/s11947-017-1872-9.
- Sun Y., Hayakawa S., Ogawa M., Izumori K. (2007). Antioxidant properties of custard pudding dessert containing rare hexose, D-psicose. *Food Control*, 18: 220-227. doi: 10.1016/j.foodcont.2005.09.019.
- Şahin H., Topuz A., Pischetsrieder M., Özdemir F. (2009). Effect of roasting process on phenolic, antioxidant and browning properties of carob powder. *European Food Research and Technology*, 30: 155-161. doi: 10.1007/s00217-009-1152-7.
- Tamime A.Y., Deet H.C. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43(12): 939-977.
- Tárrega A., Costell E. (2007). Colour and consistency of semi-solid dairy dessert: Instrumental and sensory measurements. *Journal of Food Engineering*, 78: 655-661. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.11.003.
- Villarreal M. (2017). Value added products utilizing acid whey: development of a fruit yogurt beverage and a sports drink. Master Thesis, The

Faculty of The Graduate School of Cornell University, New York, United States, 100 pages.

Yatmaz E., Turhan I. (2018). Carob as a carbon source for fermentation technology. *Biocatalysts and Agricultural Biotechnology*, 16: 200-208. doi: 10.1016/j.bcab.2018.08.006.

Zarzycki P., Ciolkowska A.E., Jablonsk-Rys E., Gustawi W. (2019). Rheological properties of

milk-based dessert with the addition of oat gum and k-carrageenan. *Journal of Food Science and Technology*, 56(11): 107-5115. doi: 10.1007/s13197-019-03983-4.

# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Ertürkmen, P., Öner, Z. (2023). *Determination of endospore structure and volatile compounds of clostridial species during sporulation / Geç şişme etmeni clostridial türlerin sporulasyon süresince endospor yapısı ve uçucu bileşiklerinin belirlenmesi* .....499-508
- Uzun, P., Özünel, A. E., Ayabakan, M., Başkaya, H., Doğan, N., Gülay, S. M., Hantal, B., Üner, M., Barla Demirkoç, A. B. (2022). *Investigation of flavour permanence of strawberry and watermelon flavoured chewing gums by using retronasal aroma trapping device and sensory analysis techniques / Çilek ve karpuz aromalı sakızlarda aroma kalıcılığının retronazal aroma-yakalama cihazı ve duyuşsal analiz teknikleri kullanılarak araştırılması* .....408-419 Erratum / Düzetme
- Karacan, E., Özdişiciler, O., Yemişioğlu, F. (2023). *Comparative investigation of the use of Sterol composition, ECN42 difference and FTIR spectroscopy in the determination of virgin olive oil adulteration / Natürel zeytinyağı taşıyıcısının tespitinde sterol kompozisyonu, ECN42 farkı ve FTIR spektroskopisinin kullanımının karşılaştırmalı olarak incelenmesi* ..... 510-525
- Dünder, A. N., Şabin, O. I., Sarıcaoğlu, F. T. (2023). *Low-fat cookies with Chlorella vulgaris: effects on dough rheology, physical, textural and sensory properties of cookies / Chlorella vulgaris içeren az yağlı kurabiyeler: Hamur reolojisi, fiziksel, dokusal ve duyuşsal özellikler üzerine etkileri* .....526-544
- Şensu, E., Duran, A., Özçelik, B., Yücepe, A. (2023). *Investigation of changes in some bioactive properties of phenolic extracts from pulp and seed tissues of Ziziphus jujuba during in vitro digestion / Ziziphus jujuba hünnap iç ve çekirdek dokularından fenoliklerin in vitro sindirim sırasında bazı biyoaktif özelliklerindeki değişimin araştırılması*..... 602-613
- Yılmaz, E., Yücepe, E. (2023). *Screening the alkali-neutralized sunflower seed oil bleaching ability of some natural and acid-activated natural clays, synthetic adsorbents, and metal-organic frameworks / Bazı doğal ve asit-aktif doğal killerin, sentetik adsorbanların ve metal-organik çerçevelerin alkali-nötrale ayıçığı yağı ağartma yeteneklerinin incelenmesi*.....653-669
- Şanlı T. (2023). *Investigation of utilizing whey in dairy-based dessert formulations with carob powder / Keçi boynuzu tozu içeren süt esaslı tatlı formülasyonlarında peyniraltı suyu kullanımının araştırılması* ..... 670-681

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Baysan, U., Koç, M., Güngör, A., Kaymak Ertekin, F. (2023). *2-fazlı pirinanın ön kurutulmasının gerekliliği ve valsli kurutucu kullanımı / The necessity of pre-drying 2-phase olive pomace and the usage of drum dryer* .....562-574
- Balki, V. M., Demirel Zorba, N. N., Çakıcı, N. (2023). *Yeşil sebzelerde genişlemiş spektrumlu beta- laktamaz ve karbapenemaz üreten Enterobacterales suşlarının araştırılması / Investigation of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase producing Enterobacterales strains in green vegetables* .....575-586
- Toplu, B., Sıramaz, H., Ayhan, Z. (2023). *Farklı ambalaj materyalleri ve vakum/modifiye atmosfer ambalajlamanın dilimlenmiş Hatay peynirinin kalitesi ve raf ömrüne etkisi / The effects of different packaging materials and vacuum/modified atmosphere packaging methods on the quality and shelf life of sliced Hatay cheese* .....587-601
- Mutlu, C., Korkmaz, F. (2023). *Ultrasonikasyon ve soksalet yöntemleriyle ekstrakte edilen ketencik tohum yağlarının oksidatif özelliklerinin belirlenmesi / Determination of the oxidation properties of camelina seed oils extracted by ultrasonication and Soxhlet methods* .....627-640
- Şanlı, Y., Coşkun, H. (2023). *Düzce'de yetiştirilen Anadolu ırkı manda sütlerinde laktasyon boyunca meydana gelen değişimler / Changes in the milk of Anatolian buffalo raised in Düzce during lactation period*.....641-652

## Derlemeler / Reviews

- İşgüzar, E. E., Fincan, M. (2023). *Şeker ekstraksiyonunda vurgulu elektrik alan uygulama potansiyelinin değerlendirilmesi / Potential use of pulsed electric fields in sugar extraction* .....545-561
- Zadeh, J. H., Paçır, F. (2023). *Investigation of the potential applications of cold plasma technology in food safety / Soğuk plazma teknolojisinin gıda güvenliği alanındaki potansiyel uygulamalarının araştırılması* .....614-626