

Cilt 39
Volume

Sayı 1
Number

2024
Basılı ISSN 2636 - 7874
Printed

Çevrimiçi ISSN 2630 - 6034
Online

Çukurova
TARIM
ve **GIDA**
Bilimleri Dergisi

Çukurova Journal of
AGRICULTURAL
and **FOOD**
Sciences

Çukurova
Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi



Çukurova
Journal of Agricultural and Food Sciences

Basılı ISSN 2636 - 7874
Printed

Çevrimiçi ISSN 2630 - 6034
Online

Ürün Bilgisi (Product Information)

Yayıncı
Publisher

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Çukurova University Faculty of Agriculture

Sahibi (ÇÜZF adına)
Owner (on behalf of ÇÜZF)

Salih KAFKAS, Dekan (Dean)

Teknik Sekretery
Technical Secretary

Hasan YILDIRIM
Murat ACAR

Basımevi Adresi
Printing House

Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset
Atölyesi Balcalı, Sarıçam 01330 Adana-
TÜRKİYE

Basım Tarihi
Date of Publication

28/06/2024

Dil
Language

Türkçe - İngilizce
Turkish - English

Yayın Türü
Type of Publication

Hakemli Süreli Yayım
Double-blind peer reviewed

“Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi” yayın hayatına 1 Ocak 2016 tarihi itibarıyla “Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi” adıyla devam etmektedir.

From January 1, 2016 “Çukurova University Journal of Faculty of Agriculture” continuous its publication life as “Çukurova Journal of Agriculture and Food Sciences”.

Yönetim Adresi

Çukurova Tarım Gıda Bil. Der.
Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Yayın Ünitesi
Balcalı-Sarıçam 01330 Adana

Management Address

Çukurova J. Agric. Food Sci.
Çukurova University Faculty of Agriculture
Publication Department
Balcalı-Sarıçam 01330 Adana, TURKEY

Telefon : 0 322 338 60 84 / 2115-2119
Faks : 0 322 338 63 64
E-posta: ctgbdeditor@cukurova.edu.tr

Phone : 0 322 338 60 84 / 2115-2119
Fax : 0 322 338 63 64
E-mail : ctgbdeditor@cukurova.edu.tr



Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi

Çukurova Journal of Agricultural and Food Sciences

Editörler Kurulu

Editorial Board

Orhan BOZAN	Çukurova Üniversitesi
Ladine BAYKAL ÇELİK	Çukurova Üniversitesi
E. Bülent ERENOĞLU	Çukurova Üniversitesi
Ufuk GÜLTEKİN	Çukurova Üniversitesi
Ahmet Naci ONUS	Akdeniz Üniversitesi
Ozhan ŞİMŞEK	Erciyes Üniversitesi
Eşref İRGET	Ege Üniversitesi
Savaş KORKMAZ	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Ayten NAMLİ	Ankara Üniversitesi
Handan VURUŞ AKÇAOZ	Akdeniz Üniversitesi
Abdullah SESSİZ	Dicle Üniversitesi
Haşim KELEBEK	Adana Alparslan Türkeş Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi
Emel OZ	Atatürk Üniversitesi
Zümrüt AÇIKGÖZ	Ege Üniversitesi
Hasan Hüseyin ÖZTÜRK	Çukurova Üniversitesi
İbrahim ORTAŞ	Çukurova Üniversitesi
Hakan ÖZKAN	Çukurova Üniversitesi
Haydar ŞENGÜL	Çukurova Üniversitesi
Burçak KAPUR	Çukurova Üniversitesi
Uğur SERBESTER	Çukurova Üniversitesi
Sevil CANTÜRK	Çukurova Üniversitesi
Yılmaz BAYHAN	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Baş Editör

Editor-in-chief

Serkan Selli

Çukurova Üniversitesi

Editör Asistanı

Asisstant Editor

Gamze Güçlü

Çukurova Üniversitesi

Bilimsel Danışma Kurulu.

Advisory Board

Pınar KADİROĞLU KELEBEK	Adana Alparslan Türkeş Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi
Kemal ŞEN	Neveşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi
Haşim KELEBEK	Adana Alparslan Türkeş Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi
Ezgi Demir ÖZER	Kapadokya Üniversitesi
Duygu ALP	Ardahan Üniversitesi
İlkay Turhan KARA	İstanbul Arel Üniversitesi
Ladine BAYKAL ÇELİK	Çukurova Üniversitesi
Zeynep ŞAHAN	Adıyaman Üniversitesi
Tülin Çiçek Rathert	Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Mehmet ULAŞ	Zeytinlik Araştırma Enstitüsü
Mehmet TÖTÜNCÜ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Mehmet Ali SARIDAŞ	Çukurova Üniversitesi
Derya ALKAN	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Dilhun Keriman Arserim UÇAR	Bingöl Üniversitesi
Başar SEVİNDİK	İzmir Demokrasi Üniversitesi
Akife DALDA ŞEKERCİ	Erciyes Üniversitesi
Türkan UZLAŞIR	Adana Alparslan Türkeş Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi
Hülya GÜL	Süleyman Demirel Üniversitesi
Olca BOZDOĞAN	Malatya Turgut Özal Üniversitesi
Ramazan GÜRBÜZ	İğdir Üniversitesi
Mehmet GÜLDÜR	Harran Üniversitesi
Pınar ŞANLIBABA	Ankara Üniversitesi
Sebahat ÖZTEKİN	Bayburt Üniversitesi
Hande DEMİR	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi
Mustafa USTA	Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Filiz Randa ZELYÜT	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi
Handan ÇULAL KILIÇ	İsparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Dicle DÖNMEZ	Çukurova Üniversitesi
İbrahim TAPKI	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi
Mahmut KESKİN	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi
Alper ÖNENÇ	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Alper DARDENİZ	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Önder KAMİLOĞLU	Mustafa Kemal Üniversitesi
Demir KÖK	Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi
Tolga İZGÜ	İtalya Ulusal Araştırma Kurumu
Özlem KILIÇ BÜYÜKKURT	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi
Tülin EKER	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi
Ahmet Salih SÖNMEZDAĞ	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Kamil Emre GERÇEKASLAN	Neveşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi
Hande BALTACIOĞLU	Niğde Ömer Halis Demir Üniversitesi
Bekir Gökçen MAZİ	Ordu Üniversitesi
Deniz Levent KOÇ	Çukurova Üniversitesi
Yusuf AYDIN	Gaziantep Üniversitesi
Onur KETENOĞLU	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Aslı YORULMAZ	Adnan Menderes Üniversitesi
Yavuz YÜKSEL	Balıkesir Üniversitesi
Özgül KARAGÜZEL	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Kevsir KARAMAN	Erciyes Üniversitesi
Veysel AYDIN	Batman Üniversitesi
Özge SÜFER	Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi
Çiğdem SABBAĞ	Ardahan Üniversitesi
Nurten CENGİZ	Adana Alparslan Türkeş Bilim Ve Teknoloji Üniversitesi
Derya ALKAN	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi
Songül KESEN	Gaziantep Üniversitesi

Amaç ve Kapsam

Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, Tarım, Orman, Gıda, Çevre, Peyzaj, Su Ürünleri, Biyoloji ve Biyoteknoloji alanlarında hazırlanan daha önce başka bir yerde yayınlanmamış araştırma ve derleme makaleleri Türkçe veya İngilizce olarak yayımlar.

Aims and Scope

Çukurova Journal of Agricultural and Food Sciences publishes original papers and review articles dealing with agriculture, forestry, food sciences, environment, landscape, fisheries, biology and biotechnology in Turkish or English.

İçindekiler - Contents

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions Farklı Depolama Koşullarında Saklanan Farklı Genotipe Ait Yumurtaların Kalite ve Mikrobiyolojik Yönden Karşılaştırılması F. YENİLMEZ, A.BÜLANCAK, N.YILMAZ, E.URUK	1-12
Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (Olea europaea L.) Bazı Zeytin Çeşitlerine Ait Fenolojik Gelişim Evreleri C.DÖLEK, M.T. ÖZKAYA	13-24
Zeytinde Eşeyssel Uyumsuzluk Durumunun Belirlenmesi ve Uyumsuzluk Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri Determination of Sexual Incompatibility Case and the Availability of Pollination Methods for Incompatibility Research in Olive C. KAPLAN, Ş. KARABIYIK, D. DÖNMEZ, Ö. ÇETİN, N. METE, Ö. ŞİMŞEK, Y.A. KAÇAR	25-34
Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of A Kefir Drink Fortified With Propolis Propolisle Zenginleştirilmiş Kefir İçeceğinin Mikrobiyolojik, Fizikokimyasal ve Duyusal Özelliklerinin Araştırılması E.Ş. BAGDAT, O. KAHRAMAN İLİKKAN,	35-44
Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review Maya Mikrobiyotası ve Türkiye'den Ekşi Maya Haritası: Derleme A.SEVGİLİ, Ö. ERKMEN	45-55
Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi Effect of Vermicompost on Salt Stress Tolerance of Different Grapevine Rootstocks H. BİLİR EKİBİ, M. İLHAN	56-67
The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province Seraların Tarımsal ve Yapısal Yönden İncelenmesi ve Geliştirilmesi Üzerine Bir Araştırma: Mersin İli Örneği B. KAPUR, D. SOLMAZ, U. KEKEÇ, M. ERKAN CAN	68-81
Effect of <i>Spirulina platensis</i> on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production Glutensiz Fonksiyonel Bisküvi Üretiminde <i>Spirulina Platensis</i> 'in Tekstürel, Duyusal ve Bazı Fizikokimyasal Özellikler Üzerine Etkisi E.ÇAKIR, H. BEKİROĞLU, B. GÖKER, O. SAGDIÇ	82-96
Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction Sızma Zeytinyağı Ekstraksiyonunun Yoğurma Prosesinde Yardımcı Katkı Maddesi Olarak Tuz ve Kalsiyum Karbonatın Kullanımı F. KÖYLÜOĞLU, S. AYDIN, G. ÖZKAN	97-107
Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi Evaluation of Bioactive Properties, Aflatoxin and Ochratoxin A Levels of Dried Figs M. USLU, H.K. ŞAŞMAZ, E.ERELİ, H.KELEBEK	108-125
Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (<i>Myrtus communis</i> L.) Genotypes Mersin (<i>Myrtus communis</i> L.) Genotipleri İçin Sentetik Tohum Üretimi ve Kriyoprezervasyon. S. ÖZBAY, M.A. ISAK, Ö. ŞİMŞEK	126-136
Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β-Glukozidaz ve β-Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki The Relationship Between Intracellular and Extracellular Folate Production and β -Glucosidase and β -Galactosidase Enzyme Production of Lactobacillus Genus Bacteria B. ÇINAR ACAR, H. YÜKSEKDAĞ.	137-152
PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey PASTINNOVA Projesi, Sürdürülebilir Pastoral Hareketlilik Yaşam Laboratuvarı: Türkiye Vaka Çalışması. N. KOLUMAN, A. RAGKOS, S. GÖNCÜ	153-161
Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (<i>Pennisetum glaucum</i>) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi The Effect of Germination on the Chemical Composition, Phenolic and Antioxidant Potential of White, Red, and Black Millet (<i>Pennisetum glaucum</i>) Flour T. EKER, R. TURAN	162-181
Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars Yıllandırılmış Sirkelerde Kolorimetrik Özellikler ile Fenolik Bileşikler Arasındaki Korelasyon. R. S. UYSAL	182-191
Potential Application of Chitosan Based Edible Coating Combined with Pomegranate and Lemon Peel Phenolic Extract on Apple and Kiwifruit Slices: Physical, Chemical and Sensory Characteristics Elma ve kivi dilimlerinde nar ve limon kabuğu fenolik ekstraktı ile birleştirilmiş kitosan bazlı yenilebilir kaplamanın potansiyel uygulaması: Fiziksel, kimyasal ve duyuşsal özellikler BURUN, G. KUTLU, F. TORNUK	192-207
Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi Determination Occurrence of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Infection on Host Weed Species in Greenhouse Tomato and Pepper in the Mediterranean Region. P. KELEŞ ÖZTÜRK, Ş. YAVUZ, H. TORUN	208-219
Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu Detection and Molecular Characterization of Grapevine Fanleaf Virus in Vineyards of Çanakkale Province. A. ŞİRİN, A. KARANFİL, S. KORKMAZ	220-230
The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (<i>Narcissus</i> L.) Flowers Gümüş ve Bakır Nano Partikül İçerikli Vazo Solüsyonlarının Kesme Nergis (<i>Narcissus</i> L.) Çiçeklerinin Vazo Ömrüne Etkileri A. DALDA ŞEKERCİ, G. BARUT, H. S. ÖZDAL, H. T. ÜNSAL	231-240
Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme Shift Work and Nutritional Behaviour: An Assessment on Employees at Tekirdağ T Type Closed Penal Institution Ç.BOZKIR, T. KARTAL, E. AK	241-253



Araştırma Makalesi

**Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained
Different Genotypes under Different Storage Conditions**

Fatma YENİLMEZ¹, Ayşen BULANCAK², Nurten YILMAZ³, Emine URUK⁴

ABSTRACT

The present study was conducted to compare egg quality and microbiology traits in eggs from different genotypes under different storage conditions. A total of 880 eggs, obtained from Nick Chick, Dekalb, Lohmann Brown and Atabey (Native Hybrid) hens, flocks aged 56 weeks, were used in the experiment. The eggs were divided into two groups which were stored in wholesaler conditions and consumer conditions for 4 weeks during the summer season. External and internal quality traits of eggs and mold-yeast and total bacteria levels were measured. Egg quality criteria results suggest that Lohmann eggs are less affected by wholesaler conditions. Haugh unit, which is an important indicator of albumin quality, was least effective in Atabey eggs stored under wholesaler conditions. The microorganism load of the eggshell did not increase under both store conditions. The total amount of microorganisms, mold and yeast were generally acceptable limits at the end of the 4th week.

Keywords: Egg microbiology, egg quality, shelf life, storage temperature, different genotypes

**Farklı Depolama Koşullarında Saklanan Farklı Genotipe Ait Yumurtaların Kalite ve
Mikrobiyolojik Yönden Karşılaştırılması**

ÖZ

Bu çalışma farklı genotiplere ait yumurtaların farklı depolama koşullarında depolanmasının yumurta kalitesi ve mikrobiyolojisine etkisini karşılaştırmak amacıyla yürütülmüştür. 56 haftalık Nick Chick, Dekalb, Lohmann Brown ve Atabey (yerli hibrit) tavuklara ait toplam 880 adet yumurta ile yapılmış ve yumurtalar toptancı ve tüketici koşullarında 4 hafta süreyle yaz mevsiminde depolanmıştır. Yumurtaların dış ve iç kalite özellikleri ile küf-maya ve toplam bakteri düzeyleri ölçülmüştür. Yumurta kalite kriterleri sonuçları, Lohmann yumurtalarının toptancı koşullarından daha az etkilendiğini göstermiştir. Yumurta iç kalite kriterlerinin en önemli göstergelerinden biri olan Haugh birimi toptancı koşullarında depolanan Atabey yumurtalarında en az düzeyde etkilenmiştir. Yumurta kabuğunun mikroorganizma yükü her iki koşulda da artmamış ve araştırma sonunda toplam mikroorganizma, küf ve maya miktarı genel olarak kabul edilebilir sınırlar içerisinde kalmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yumurta mikrobiyolojisi, yumurta kalitesi, raf ömrü, depolama sıcaklığı, farklı genotip

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-5470-7974, 0000-0002-4324-9063, 0000-0003-3867-509X, 0000-0002-4324-9063

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 20.12.2023

Kabul Tarihi: 20.12.2023

¹ Çukurova Üniversitesi, Tufanbeyli Meslek Yüksekokulu

² Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti Tarım Ve Doğal Kaynaklar Bakanlığı

³ Çukurova Üniversitesi, Karaisalı Meslek Yüksekokulu

⁴ Adana Tarım ve Orman İl Müdürlüğü

*E-posta: fyenilmez@cu.edu.tr

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

Introduction

The interior structure of an egg includes all nutrients that are sufficient for the development of a new living being. However, its consumption may be harmful to human health since nutrients content starts deteriorating by time when they are not preserved with care before consumption. As soon as the egg is laid due to its natural structure and contents, the egg is resistant against microbiologic disruptions and can keep its freshness. However, after eggs are laid, certain biological, chemical, and physical changes commence in it. The egg starts to cool down and its interior volume decreases, creating an air cell. Eggshell is covered with a water-resistant 20-30 microns' thick mucus layer, made of protein during laying. This protein coat prevents gas and any external microorganisms from penetrating it. There are 7000-17000 stomas on the eggshell and their size may vary based on several conditions (high temperature, high humidity, longtime storage, etc.). These stomas widen over time and the structure of mucus decays and cannot prevent microorganism penetration to egg at long-term storage conditions (Solomon, 2010; Kulshreshtha et al., 2022). This causes deterioration in the internal quality of the egg. Parameters such as albumen index, yolk index, Haugh unit, ΔE (yolk color differences), albumen pH, L , a^* , b^* color value are used in determining the internal quality of the egg. The albumen index, pH and Haugh unit are the most important criteria used in determining internal egg quality (Doğan and Uluocak, 2008; Saribaş and Yamak, 2021). Albumen pH of fresh eggs is 7.6-8.5 and as the duration of storage is extended, the pH value of the albumen increases as carbon-dioxide and moisture loss does. Parallel to this, mucin, a component that gives the albumen a colloidal form loses this trait, and albumen becomes somewhat liquid. The quality of albumen is measured using the Haugh unit, invented by Raymond Haugh (Haugh, 1937). For edible eggs, this value should be higher than 79 in AA qualities, between 55-78 for A quality, between 31-54 for B quality, and 30 or lower in C quality (Şenköylü, 1995). Egg yolk should be yellow and located in the middle for fresh eggs. In time, due to the deterioration of the vitelline

membrane, egg yolk drains water from albumen and loses its circular shape and becomes flatter. Egg yolk pH value is around 6.0 in fresh eggs and this value increases during the storage extend, as in albumen (Wang et al., 2017). It is possible to slow down such deteriorations by storing the eggs under better conditions.

This study was conducted to determine the quality and microbiology of eggs from chickens with four different genotypes stored under wholesaler and consumer conditions during the summer season and to contribute to the consumer's egg preference.

Material and Methods

This experiment was carried out with a total of 880 eggs (220x4) obtained from Nick Chick, Dekalb, Lohmann Brown and Atabey (Native Hybrid) hens, 56 weeks old age in summer season (average temperature 36°C) in Adana, Turkey. The quality criteria and microorganism level were evaluated in eggs stored under different temperature conditions. Each genotype of eggs was divided into two groups which were stored under room temperature ($+29\pm 2^\circ\text{C}$; wholesaler conditions) and under refrigerator conditions ($+4\pm 1^\circ\text{C}$; consumer conditions) for four weeks. During the experiment, which lasted four weeks, internal quality traits of eggs were measured weekly. Albumen index, yolk index, and albumen pH value were measured. Egg weight loss (%), albumen and egg yolk weight, L , a^* , b^* value (HunterLab, Colorflex EZ, United States of America), albumen and egg yolk height, albumen and egg yolk diameter were measured and changes in the yolk index, albumen index, Haugh unit, albumen pH, ΔE were recorded in terms of interior quality measures.

Preparations of Egg Shells

Randomly selected 5 eggs from each group were put in a sterile plastic bag, and bags considered as one composite sample. Buffered peptone water was (100 mL) poured into the egg samples in sterile bags, washed and scrubbed with fingers five min (ISO, 1993). Then first dilution from homogenized eggshell surfaces was obtained using other dilutions.

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

Total Mesophilic Aerobic Bacteria (TMAB) Count

Ten-fold dilution was obtained from sterile peptone water up to 10^{-9} from homogenized eggshell surfaces. Then 1 mL taken from the first homogenized sample added in 9 mL sterile peptone water. Thus secondly dilution was prepared. Different dilution of samples was inoculated 0.1 mL on PCA (Plate Count Agar) with drigalski spatula and incubated 24-48 h at 37°C. After incubation, colonies are counted by the Most Likely Number Method and calculated with the logarithmic Colony Forming Units (log CFU) per mL (Harrigan, 1998).

Total Mold-Yeast Count

For mold-yeast counts, eggshell dilutions from samples used up to 10^{-9} with 0.5 mL sterile pipettes and spread plate technique on Potato Dextrose Agar (PDA) plates with drigalski

spatula. Plates incubated five days at 25°C and colonies counted (by MPN Method) and calculated by log CFU per mL (Andrew, 1992).

Statistical analysis

All data obtained from the experiment were analyzed using the IBM SPSS 19.0 (IBM, 2010) statistical software package program. The normal distribution of data was analyzed as a completely randomized variance design (ANOVA) and the Tukey test used the comparison of means. The statistical significance level was defined as $P \leq 0.05$.

Results

The results of the experiment, egg weight loss increased linearly with storage time and highest at wholesaler condition ($P < 0.05$). It was affected weeks and genotypes but not with conditions (Table 1).

Table 1. Interactions of different storage condition on egg quality characteristics obtained from different genotypes

Parameters n=880	Condition	Week	Genotype	Condition x Week	Condition x Genotype	Week x Genotype	Condition x Week x Genotype
Egg weight loss (%)	0.056	0.020	0.05	0.189	0.505	0.831	0.010
Yolk weight (g)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.106	0.111	0.071
pH	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.993	<0.01	0.112
Yolk index	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
Albumen index	<0.01	<0.01	0.01	<0.01	<0.01	0.044	<0.01
Haugh Unit	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
ΔE	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.032	0.550	0.047
<i>L</i>	<0.01	0.060	<0.01	<0.01	<0.01	0.049	<0.01
<i>a</i> *	0.037	<0.01	0.142	0.086	0.836	0.560	0.809
<i>b</i> *	<0.01	<0.01	0.071	<0.01	0.166	0.372	0.321

L: Brightness, *a**: Redness, *b**: Yellowness, ΔE : Yolk color differences

The best results were obtained at Lohmann eggs 5.90% and 3.68% respectively at the 4th week for wholesaler and consumer conditions (Table 2, 3).

As indicated in Table 1, egg pH was affected by week, genotype, storage conditions and their interactions ($P < 0.01$). At the end of the 4th week, pH value was lower in Nick eggs (9.49) under wholesaler conditions, and in Lohmann eggs (9.25) under consumer conditions (Table 2, 3). At the end of the 4th week, there are no

differences on yolk index, albumen index, HU, *L* and *a** values under wholesaler conditions (Table 2). The highest yolk index was obtained from Lohmann eggs and was found to be 49.76 at the beginning of the experiment (0 day), 15.65 under wholesale conditions and 45.37 under consumer conditions at the end of the 4th week (Table 2, 3). The best results in terms of albumen index were obtained from Nick eggs, it was determined as 12.33 at the beginning of storage time, and as 1.66 at the end of the 4th week under

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

wholesaler condition. It was also determined the highest albumen index on Dekalb eggs was 8.87 in consumer conditions (Table 2, 3). Nick genotype showed the highest HU value (95.33) at the beginning of the storage day. The

best Haugh unit value was determined from Atabey eggs (42.00) under wholesaler condition and from Dekalb eggs (83.77) under consumer condition at the end of the 4th week (Table 2, 3).

Table 2. Effect of wholesaler storage condition on egg quality characteristics obtained from different genotypes

Parameters n=440	0 day				2.week				4.week				P
	N	D	LH	A	N	D	LH	A	N	D	LH	A	
Egg weight loss (%)	-	-	-	-	3.71	4.28	3.34	3.96	6.77	7.17	5.90	7.25	<0.01
Yolk weight (g)	15.49	15.46	13.98	15.39	17.78	16.20	15.53	16.66	18.14	17.53	16.45	17.37	<0.01
pH	8.34	8.35	8.28	8.43	8.71	8.65	8.65	8.72	9.49	9.59	9.54	9.64	<0.01
Yolk index	42.15	41.61	49.76	40.99	24.11	23.58	26.51	20.88	12.81	13.70	15.65	13.03	0.069
Albumen index	12.33	11.01	10.54	10.47	3.05	3.30	3.21	2.52	1.66	1.61	1.56	1.59	0.310
HU	95.33	90.97	88.06	90.53	52.13	58.33	58.02	49.74	39.23	40.75	39.54	42.00	0.479
ΔE	85.77	87.18	85.68	86.87	99.73	100.03	97.89	99.77	100.50	100.10	99.97	101.02	<0.01
L	60.53	60.23	59.15	60.38	61.10	60.15	60.86	61.50	60.63	60.73	60.39	60.89	0.527
a*	17.53	17.61	17.70	17.85	18.63	19.26	18.73	18.03	19.36	19.05	18.52	19.43	0.418
b*	58.09	60.27	59.33	59.79	76.47	77.52	74.30	76.39	77.69	75.15	77.38	78.12	<0.01

L: Brightness, a*: Redness, b*: Yellowness, N: Nick, D: Dekalb, LH: Lohmann Brown, A: Atabey, ΔE: Yolk color differences, HU: Haugh Unit

In the study, no difference was observed between the genotypes in terms of L value, but a* and b* values were statistically important (P<0.01). Lightness (L), redness (a*),

yellowness (b*) of yolk were affected by the storage conditions (P<0.01, P<0.05, P<0.01, respectively).

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

Table 3. Effect of consumer storage condition on egg quality characteristics obtained from different genotypes

Parameters n=440	0 day				2.week				4.week				P
	N	D	LH	A	N	D	LH	A	N	D	LH	A	
Egg weight loss (%)	-	-	-	-	1.91	2.62	2.43	2.39	3.78	4.80	3.68	4.26	<0.01
Yolk weight (g)	15.49	15.54	13.98	15.39	15.57	16.05	15.27	16.24	16.70	16.47	16.43	16.74	0.020
pH	8.40	8.34	8.28	8.43	8.73	8.78	8.75	8.84	9.32	9.29	9.25	9.37	0.026
Yolk index	46.40	44.77	49.76	46.73	42.87	43.57	46.42	44.12	40.73	40.82	45.37	41.23	<0.01
Albumen index	12.33	10.83	10.54	10.47	9.26	9.07	6.56	7.81	8.55	8.87	6.31	7.14	<0.01
HU	95.33	90.97	88.06	90.53	84.95	80.17	80.32	81.27	81.88	83.77	74.16	77.66	<0.01
ΔE	85.77	87.38	85.68	86.87	88.10	88.44	86.26	89.71	92.25	90.83	89.23	91.89	0.012
L	60.53	60.20	59.15	60.38	59.25	60.11	58.44	60.76	57.88	59.43	57.66	59.57	0.022
a *	17.53	17.69	17.70	17.85	18.51	18.02	17.85	18.32	19.32	18.59	19.03	19.09	0.772
b *	58.09	60.57	59.33	59.79	62.27	62.03	60.76	63.29	68.99	65.98	65.21	67.17	0.041

L: Brightness, a*: Redness, b*: Yellowness, N: Nick, D: Dekalb, LH: Lohmann Brown, A: Atabey, ΔE: Yolk color differences, HU: Haugh Unit

Color change (ΔE value) of yolk was affected by storage condition, week, genotype (P<0.01) (Table 1).

The lowest total bacteria level was measured for Lohmann eggs at the beginning of the storage day (4.22 log CFU/mL) (Figure 1).

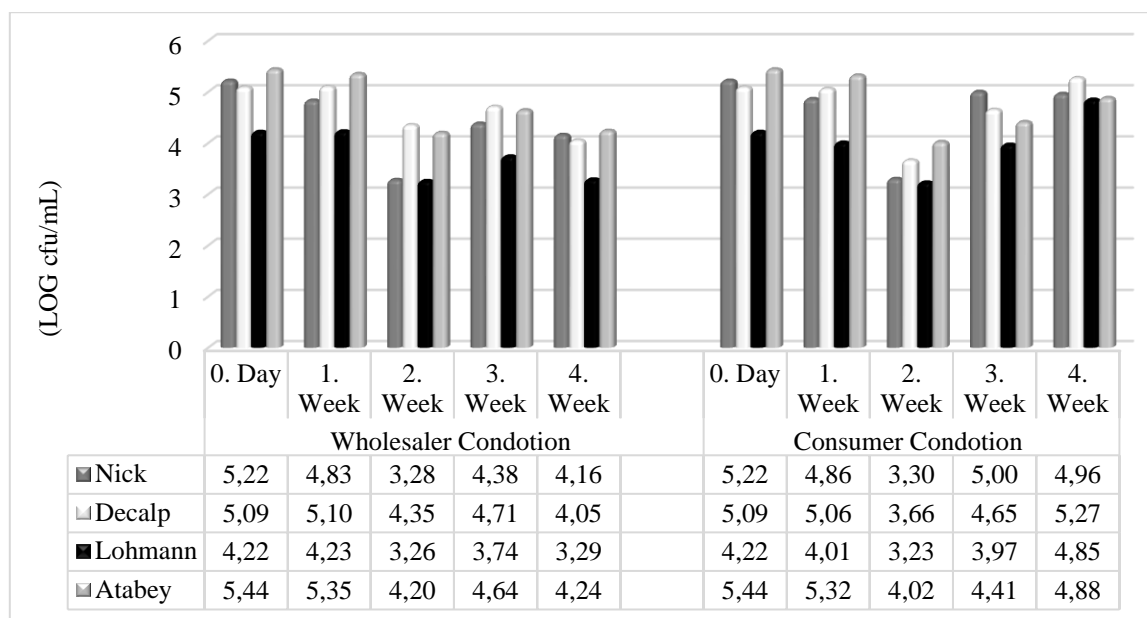


Figure 1. Total bacteria of eggs of different genotypes stored under wholesaler and consumer storage condition (n=200)

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

The total bacteria level decreased Lohmann genotype (3.29 log CFU/mL) in the wholesale storage condition and the Atabey hybrid (4.88

log CFU/mL) in the consumer storage condition at the end of the 4th week (Figure 1).

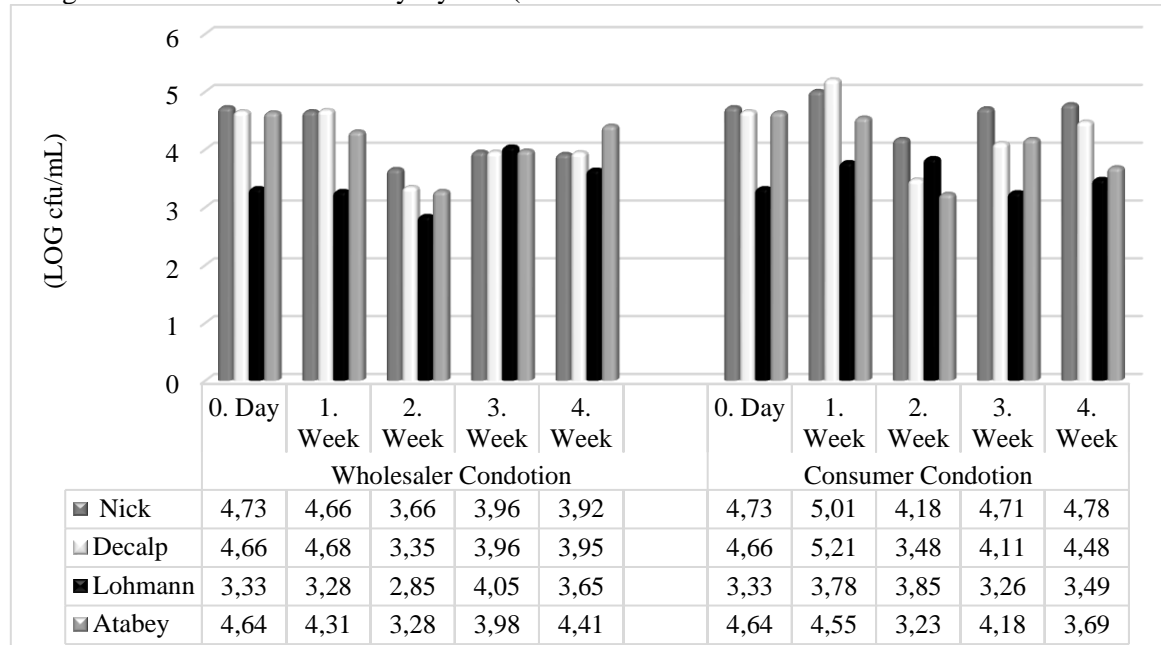


Figure 2. Total mold-yeast of eggs of different genotypes stored under wholesaler and consumer storage condition (n=200)

According to the results of the research, the lowest mold-yeast level was measured with 3.33 log CFU/mL in Lohmann genotype at the beginning of the storage day. Similarly, the lowest mold-yeast level was determined as 3.65 log CFU/mL for wholesaler storage condition and as 3.49 log CFU/mL for consumer condition in Lohmann at the end of the 4th week (Figure 2).

Discussion

When purchasing eggs, consumers initially priorities the assessment of egg freshness. The degree of freshness in eggs is directly correlated with the extent to which internal quality features are maintained. Therefore, it is imperative to establish suitable conditions that can effectively maintain the freshness of eggs throughout storage. The negative effect of extended storage period and elevated temperatures on egg quality, freshness, and shelf life has been documented in several studies (Mathew et al., 2016; Ronald Santos et al., 2019; Altunatmaz et al., 2020; Chousalkar et al., 2021). According to Martinez et al. (2021), the duration and temperature of

storage were found to have a substantial effect on both the internal and external quality of eggs. Several studies have documented a notable reduction in egg weight with increasing temperature and period of storage (Siyar et al., 2007; Lee et al., 2016; Hagan and Eichie, 2019; Yamak et al., 2021). The present study observed a linear rise in egg weight loss as storage time increased, which aligns with the findings reported in the aforementioned publications. Upon evaluating the study findings with respect to genotypes, it was seen that the most favourable outcomes in relation to wholesaler and consumer conditions were observed during the fourth week in Lohmann eggs, with percentages of 5.90% and 3.68% respectively. As temperature and storage time rise, it is well known that the egg's internal quality decreases (Jin et al., 2011; Martinez et al., 2021). Furthermore, storage is said to have an impact on quality even in the short term (Gavril and Usturoi, 2012). The parameters that are most effected by these conditions include electrical conductivity, albumin and yolk pH, Haugh unit,

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

air cell height, and albumin height (Şamlı et al., 2005; Jin, et al., 2011; Okur and Şamlı, 2013). Numerous studies have shown that while albumin and yolk width, pH, and yolk weight are increasing during storage, albumin weight, albumin and yolk height, Haugh unit, and albumin and yolk index decrease (Siyar et al., 2007; Chung and Lee, 2014; Kralik et al., 2014; Hagan and Eichie, 2019; Altunatmaz et al., 2020). In this study, throughout the storage period for both conditions and all genotypes, Haugh Unit, albumen index, albumen height, and yolk height declined while the yolk weight, yolk width, albumen widths, albumen lengths, pH, and ΔE value rose. The results of this investigation were consistent with those of other investigations.

It was also mentioned that room temperature and refrigerator temperature conditions differed significantly from one another. Eggs that are intended for consumption must be refrigerated and should not be kept longer than two weeks since eggs that are kept at room temperature decay more quickly than eggs that are kept in a refrigerator (Avan and Alişarlı, 2002; Yenilmez et al., 2017). To the extent that, in refrigerated settings, the quality of the yolk height, albumen, and Haugh unit also significantly decreases (Yamak et al., 2021). In the same way, under both wholesaler and consumer conditions in this investigation, the Haugh unit and albumen height decreased, while under wholesaler conditions, yolk height increased.

Numerous researchers have reported that pH values rise with storage temperature and duration (Scott and Silversidest, 2000; Siyar et al., 2007; Alsobayel and Albadry, 2011; Chung and Lee, 2014; Kralik et al., 2014; Mathew et al., 2016). In a similar vein, all genotypes in this study under both conditions have seen an elevation in pH during the course of storage. The analyses revealed that, whereas Nick eggs had the lowest pH value under wholesaler conditions, Lohmann eggs had the lowest pH value under consumer conditions.

The yolk in the Turkish Food Codex Egg Communique should be visible in the center

during a light examination as a circle and a shadow; it should also not include any foreign objects and should not detach from the center when the egg is turned (TSE, 2015). In TS 1068, there is no specified value for egg yolk. Furthermore, according to Mineki and Kobayashi (1998), the yolk index value, which measures the egg yolk's capacity to hold erect without spreading, can range from 36-44% in fresh eggs. According to Doğan and Uluocak (2008), the yolk index of fresh eggs ranges from 40 to 46, but Sarıca and Erensayın (2018) assert that the egg yolk index need to exceed 46. In this research, Lohmann eggs had the highest yolk index at the end of storage under both wholesaler (15.65) and consumer conditions (45.37). In consumer conditions, Lohmann eggs were able to maintain their freshness for up to four weeks based on the yolk index; in wholesaler conditions, this preservation was limited to the first day. Conversely, in both consumer and wholesaler conditions, other genotypes eggs only satisfied the first-day freshness requirements.

The Turkish Food Codex Egg Communique (TSE, 2015) and Turkish Standards Institute TS 1068 both provide no value for the egg albumen index. However, one of the most crucial factors in assessing the quality of eggs is the albumen index. It is desirable that it be high in both table and breeding eggs. The normal limits of the albumen index value are between 8-11.8% (Jin et al., 2011). As per the results of this investigation, Nick eggs showed the best albumen index values on the first day of examination. Similarly, when four genotypes of eggs are examined at the end of 4th week, the best outcomes are achieved from Nick eggs under wholesaler conditions and Dekalb eggs under consumer conditions. At the end of 4th week, it was found that, under consumer conditions (in the refrigerator), Lohmann and Atabey eggs stayed below standard limits, whereas Nick and Dekalb eggs were within normal limits (8.55, 8.87). Only the first day's albumen index under wholesaler settings was within normal bounds; in the first, second, third, and fourth weeks, it was below normal limits. These findings show that eggs from Nick and Dekalb can be kept fresh

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

for four weeks under consumer conditions (+4C°), whereas eggs from the other groups can only keep freshness for the first week under wholesaler conditions (+29C°) in the summer. The results of this study are same line with to the findings of Altunatmaz et al. (2020).

For a variety of applications, it is the most often used Haugh unit for determining albumen quality. In addition, Doğan and Uluocak (2008) state that the Haugh unit is a crucial factor in assessing the freshness of eggs. The Turkish Food Codex Egg Communique (TSE, 2015) and Turkish Standards Institute TS 1068 both list the minimum quality requirements for Class A eggs as ≥ 72 for extra fresh eggs, 71–51 for fresh eggs, and ≤ 50 for class B eggs. Haugh unit value and quality are positively correlated (Feddern et al., 2017). The quality increases with the Haugh unit value. The Haugh unit experiences a decrease due to negative effects from temperature and storage duration (Hagan and Eichie, 2019). Our study's findings indicate that while the four genotype eggs could only maintain their fresh feature for two weeks at room temperature, they were able to maintain their extra fresh feature for four weeks when stored under consumer condition. The Haugh unit was observed from Dekalb eggs in consumer condition and from Atabey eggs wholesaler conditions. Because of its superior performance in commercial conditions, local Atabey eggs are able to retain their freshness in the summer, even when left at room temperature. It is possible that this indicates the Atabey local genotype is more flexible in response to environmental changes, but the Dekalb foreign genotype can preserve its quality in standard conditions.

Egg yolk color is affected by genotype, age, lysine level in feed, rearing system, fats and antioxidants, vitamin A and calcium consumption, antibiotics and drugs, and some unknown factors (Sarica and Erensayin, 2018). Consumers' yolk color preferences vary and this is one of the most important factors affecting consumers' purchasing preferences. While dark color yellow is popular in Turkey, pale yellow is chosen in Western nations. This is because dark yellow eggs are thought to have more flavor and

nutritional value. The egg's flavor and nutritional content are unaffected by its color, though. According to consumer preference, the color of food can be changed with the help of different additives (Doğan and Uluocak, 2008; Mızrak et al., 2012; Kamanlı and Türkoğlu, 2018). In reference to egg yolk color, the Turkish Standards Institute specifies in TS 1068 that the yolk color should be distinct, although the Turkish Food Codex Egg Communique does not provide a statement for egg yolk color (TSE, 2015). In the current study, a^* and b^* values varied between the genotypes, but no change in color was seen in terms of L value. A difference between the L and b^* values was also found with regard to storage conditions. Egg color variations (ΔE value) were influenced by week, genotype, and different conditions ($P < 0.01$). The color of egg yellow becomes darker with a lower ΔE value. By the end of the 4th week, the yolk color of Lohmann eggs was darker under both conditions. The availability and profile of carotenoids in the diets are the primary determinants of egg yolk color. However, egg yolk color is also significantly influenced by genetics, hen age and breed, illnesses, living circumstances, cleanliness, use of antibiotics and other drugs (Onbaşilar and Yalçın, 2021). Given that all other experimental settings were identical, genetics might be the cause of the darker of the yolk color.

Eggshell bacterial contamination may be impacted by storage conditions (Mallet et al., 2010). To ensure that the egg is safe and does not pose a health risk to humans, the overall number of bacteria on egg shell must remain below specific thresholds. A threshold of 5 log CFU/mL was reported by De Reu et al. (2009), which may be interpreted as indicating eggshells of a hygienic quality that is acceptable. The eggshell total viable count and mean log mean values above the permitted limitations established by the International Commission on the Microbiological Specification for Food (ICMSF) of $10+10^5$ and 6.00, respectively. By the conclusion of the fourth week, the overall number of microorganisms on the eggshell was, on the whole, within allowable bounds, according to the research findings. The first day's

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

measurements of Lohmann eggs showed the lowest amount of total bacteria. Similar to this, the lowest total bacterial level was found for consumer condition in Atabey eggs, but for wholesaler condition in Lohmann eggs at the end of the 4th week. According to Kraus et al. (2022), the total number of microorganisms varied between genotypes at the conclusion of the experiment.

Kardal et al. (2018) found mold and yeast load of market and village eggshells 6.80 and 6.97 log CFU/mL. Whereas, in the current research, the mold and yeast level was less than 5 log CFU/mL. By the end of the 4th week the mold-yeast level in Lohmann eggs under both conditions was the lowest.

The experiment's findings showed that the weight loss of the eggs increased linearly with storage time and highest under wholesaler conditions. Haugh Unit, albumen index, albumen height, and albumen width decreased over the storage period for all conditions and all genotypes, but the yolk weight, yolk width, albumen widths, albumen lengths, pH, and ΔE value increased. In comparison, all group eggs can only keep their freshness for the first week under wholesale conditions (+29°C), while in the summer, Nick and Dekalb eggs may be kept fresh for 4th week under consumer conditions (+4°C). The excellent performance of Atabey regarding the Haugh unit under wholesaler conditions demonstrates that local Atabey eggs retain their freshness better even in hot weather. The lowest pH value was found in Nick eggs under wholesaler conditions and in Lohmann eggs under consumer conditions as a consequence of our evaluation of pH values. In consumer conditions, Lohmann eggs were able to maintain their freshness for up to four weeks based on the yolk index; in wholesaler conditions, this preservation was limited to the first day. Conversely, in both consumer and wholesaler conditions, other genotypes eggs only satisfied the first-day freshness requirements.

Lohmann eggs were therefore less impacted than other genotypes from wholesaler conditions. By the end of the 4th week, the overall number of

microorganisms, mold, and yeast on the eggshell was mostly within acceptable limits, and the eggshell's microbial load had not increased under wholesaler or consumer conditions. In the summer, local Atabey eggs kept their quality better even when kept in a room. Consequently, native Atabey can be preferred by breeders instead of foreign genotypes.

References

- Alsobayel, A. A., Albadry, M. A., (2011) Effect of storage period and strain of layer on internal and external quality characteristics of eggs marketed in Riyadh area. *J Saudi Soc Agric Sc* 10:41-45. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2010.04.001>.
- Altunatmaz, S. S., Aksu, F., Aktaran Bala, D., Akyazı, İ., Çelik, C. (2020) Evaluation of quality parameters of chicken eggs stored at different temperatures. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 26(2):247-254. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2019.22856>
- Andrew, W. (1992) Manual of food quality control 4. Rev. 1. Microbiological analysis. FAO of the United Nations. Rome. *FAO Food Nutr* 14(4).
- Avan, T., Alişarlı, M. (2002) The effect of storage condition on the physical, chemical and microbiological quality of the egg. *Van Vet J* 13(1-2):98-107.
- Chousalkar, K. K., Khan, S., McWhorter, A. R. (2021) Microbial quality, safety and storage of eggs. *Curr Opin Food Sci* 38:91-95. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.022>.
- Chung, S. H., Lee, K. W. (2014) Effect of hen age, storage duration and temperature on egg quality in laying hens. *Int J Poult Sci* 13(11):634-636. <https://doi.org/10.3923/ijps.2014.634.636>.
- De Reu, K., Rodenburg, T. B., Grijspreerd, K., Heyndrickx, M., Tuytens, F. A. M., Sonck, B., Zoons, J., Herman, L. (2009)

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

- Bacteriological contamination, dirt, and crack of eggshells in furnished cages and noncage systems for laying hens: an international on-farm comparison. *Poult Sci* 88:2442-2448. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00097>.
- Doğan, H., Uluocak, A. N. (2008) A study on the presentation variety and quality diversity of the eggs marketed in Adana. *J Sci Eng* 19(1):11-21.
- Feddern, V., De Pra, D. C., Mores, R., Nicoloso, R. S., Coldebella, A., Abreu, P. G. (2017) Egg quality assessment at different storage conditions, seasons and laying hen strains. *Amin Sci Ve* 41(3):322-333. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017413002317>.
- Gavril, R. N. R., Usturoi, M. G. (2012) Effects of temperature and storage time on hen eggs quality. *Seria Zootehnie* 57:221-229.
- Hagan, J. K., Eichie, F. O. (2019) Egg quality of two layer strains as influenced by extended storage periods and storage temperatures. *Livestock Res Rural Dev* 31 (9).
- Harrigan, W. F. (1998) *Laboratory methods in food microbiology*. 3rd ed., 532, San Diego, US.
- Haugh, R. R. (1937) The Haugh unit for measuring egg quality. *U.S. Egg Poult Mag* 43:522-555.
- IBM Corp. (2010) Released, IBM SPSS Statistics for Windows. Version 19.0. IBM Corp. Armonk, NY, USA.
- ISO 6579. (1993) Microbiology-General guidance on methods for the detection of Salmonella. International Organization for Standardization; Geneva, Switzerland.
- Jin, Y. H., Lee, K. T., Lee, W.I., Han, Y. K. (2011) Effects of storage temperature and time on the quality of eggs from laying hens at peak production. *Asian-Australas J Anim Sci* 24(2):279-284.
- Kamanlı, S., Türkoğlu, M. (2018) Determination of Internal and external egg quality characteristics of the White Pure Lines layers and their hybrids at the Poultry Research Institute. *Poult Res J* 15(1):23-28.
- Kardal, F., Ertas Onmaz, N., Hızlısoy, H., Yıldırım, Y., Al, S., Gonulalan, Z., Ülger, İ. (2018) The Microbiological Quality of the Village and Market Eggs Sold at Retail in Nigde and Kayseri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 15(1):51-57.
- Kralik, Z., Kralik, G., Grcevic, M., Galovic, D. (2014) Effect of storage period on the quality of table eggs. *Acta Agr Kapos* 18(1):200-206. <https://doi.org/10.13140/2.1.3231.3285>.
- Kraus, A., Zita, L., Krunt, O., Chodová, D., Okrouhlá, M., Krawczyk, J. (2022) Do the differences in egg contamination, penetration, and resistance against microorganisms among the hen genotypes exist? *Ann Anim Sci* 22(2):561-574. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0056>.
- Kulshreshtha, G., D'Alba, L., Dunn, I. C., Rehault-Godbert, S., Rodriguez-Navarro, A. B., Hincke, M. T. (2022) Properties, Genetics and Innate Immune Function of the Cuticle in Egg-Laying Species. *Front Immunol* 25(13):838525. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.838525>.
- Lee, M. H., Jung, C. E., Choi, E. S., Sohn, D. H. (2016) The effect of storage period and temperature on egg quality in commercial eggs. *Korean J Poult Sci* 43:31-38. <https://doi.org/10.5536/KJPS.2016.43.1.31>.

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

- Mallet, S., Huneau-Salaun, A., Herman, L., De Reu, K. (2010) Laying hen breeding systems and hygienic status of the eggs. *Prod Anim* 23:183-191.
- Martinez, Y., Soliz, N. D., M. A., Bejarano, M. A., Paz, P., Valdivie, M. (2021) Effect of storage duration and temperature on daily changes in external and internal egg quality of eggs from Dekalb White laying hens. *Europ Poult Sci* 85. <https://doi.org/10.1399/eps.2021.329>.
- Mathew, A. O., Alabi, O., Aderemi, F., Olusegun, S. (2016) Relationship of temperature and length of storage on pH of internal contents of chicken table egg in humid tropics. *Biotechnol Anim Husbandry* 32(3):285-296. <https://doi.org/10.2298/BAH1603285M>.
- Mineki, M., Kobayashi, M. (1998) Microstructural changes in stored hen egg yolk. *Jpn poul sci*, 35(5): 285-294.
- Mızrak, C., Durmuş, İ., Kamanlı, S., Erdoğan Demirtaş, Ş., Kalebaşı, S., Karademir, E., Doğu, M. (2012) Determination of egg consumption and consumer habits in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 36(6):592-601. <https://doi.org/10.3906/vet-1102-778>.
- Okur, A. A., Şamlı, H. E. (2013) Effects of storage time and temperature on egg quality parameters and electrical conductivities of eggs. *J Tekirdag Agric Fac* 10(2):78-82.
- Onbaşılar, İç, Yalçın, S. (2021) *The Importance of Pigments in Egg Yellow Color*. In Yalçın, S. (Eds): *Eggs: Nutrition and Health*, 1st ed., 76-84, Ankara, Turkey.
- Rayan, G. N., El-Attar, A. H., Fathi, M. M. (2020) Eggshell and bone quality in two different genetic groups of aged layer breeders. *Brazilian J Poult Sci* 22(2):001-008. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1250>
- Ronald Santos, R., Jose Segura, C., Luis Sarmiento, F. (2019) Egg quality during storage of eggs from hens fed diets with crude palm oil. *Rev MVZ Cordoba* 24(3):7297-7304. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1244>.
- Şamlı, H. A., Okur A. A., Şenköylü, N. (2005) Effects of storage time and temperature on egg quality in old laying hens. *J Appl Poult Res* 14:548-553. <https://doi.org/10.1093/japr/14.3.548>.
- Sarıbaş, O., Yamak, U. S. (2020) Production and egg quality traits of organic hens in a laying period under commercial conditions in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 44:1188-1195. <https://doi.org/10.3906/vet-2004-87>.
- Sarıca, M., Erensayın, C. (2018) *Poultry Products*. In, Sarıca, M., Erensayın, C., (Eds): *Poultry Science (Raising, Feeding, Diseases)*, 5th ed., 89-138, Ankara, Turkey.
- Scott, T. A., Silversided, F. G. (2000) Effects of temperature and storage time on hen eggs quality. *Poult Sci* 79:1725-1729.
- Şenköylü, N. (1995) *Modern Chicken Production*. 2th ed., 469, Tekirdağ, Turkey.
- Siyar, H. S. A., Aliarabi, H., Ahmadi, A., Ashori, N. (2007) Effect of different storage conditions and hen age on egg quality parameters. *Australian Poult Sci Symposium* 19:106-109.
- Solomon, S. E. (2010) The eggshell: strength, structure and function. *British Poult Sci* 51:1959-2009. <https://doi.org/10.1080/00071668.2010.497296>.
- Turkish Standards Institution (TSE). (2015) *Chicken eggs in shell*. <http://www.iib.org.tr/files/downloads/Pag eFiles/%7B379e54cc-5186-41f1-b40b->

Comparison of Egg Quality and Microbiology Traits in Eggs Obtained Different Genotypes under Different Storage Conditions

[b14034660662%7D/Files/TS_1068.pdf](#).

Accessed 06 May 2023.

- Wang, Q., Jin, G., Wang, N., Guo, X., Jin, Y., Ma, M. (2017) Lipolysis and oxidation of lipids during egg storage at different temperatures. *Czech J Food Sci* 35:229-235.
<https://doi.org/10.17221/174/2016-CJFS>.
- Yamak, U. S., Sarica, M., Erensoy, K., Ayhan, V. (2021) The effects of storage conditions on quality changes of table eggs. *Consum Prot Food Saf* 16.
<https://doi.org/10.1007/s00003-020-01299-6>.
- Yenilmez F, Uruk E, Serbester U, Çelik L. (2017) Effects of wholesaler and consumer conditions on egg quality parameters in different seasons. *Çukurova J Agric Food Sci* 32(2):61-68.



Research Article

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

Cansu DÖLEK^{1*}, Mücahit Taha ÖZKAYA²

ABSTRACT

In this study, phenological observations were made in Domat, Gemlik and Sarı Ulak olive cultivars in Tarsus region. For this purpose, inflorescences, beginning of blooming, stages of flowering by 25%, 50% and 75%, end of flowering, green and black maturity periods were determined. As a result of the study, it has been determined that there was a period of 10-15 days between the flowering (BBCH=55) and fruit setting (BBCH=69) periods of the cultivars. On average, the time from full blooming to maturity; It was determined as 179 days in Gemlik cultivar, 175 days in Sarı Ulak cultivar and 138 days in Domat cultivar. Flowering and fruit set periods in olive cultivars have a big importance for choosing indigenous cultivar selection. In this study, the effect of climate data of different years on flowering and maturity periods were evaluated. When the climate conditions with flowering and maturity parameters were evaluated together, the best suggestable cultivar for relevant region is became Sarı Ulak.

Keywords: Blooming , phenology, fruit setting, maturity, olive

Bazi Zeytin Çeşitlerine Ait Fenolojik Gelişim Evreleri

ÖZ

Çalışmada Tarsus yöresinde Domat, Gemlik ve Sarı Ulak zeytin çeşitlerinde fenolojik gözlemler yapılmıştır. Bu amaçla somak oluşumu, çiçeklenme başlangıcı, %25 çiçeklenme, %50 çiçeklenme, %75 çiçeklenme, çiçeklenme sonu, yeşil olum ve siyah olum dönemleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda çeşitlerin çiçek açma ve meyve bağlama dönemleri arasında 10-15 günlük bir süre olduğu saptanmıştır. Tam çiçeklenmeden olgunluğa kadar geçen süre ortalama olarak; Gemlik çeşidinde 179 gün, Sarı Ulak çeşidinde 175 gün ve Domat çeşidinde ise 138 gün olarak tespit edilmiştir. Zeytin çeşitlerinde çiçeklenme ve meyve tutumu dönemlerinin belirlenmesi yöreye özgü çeşit seçiminde büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada farklı yıllardaki iklim değerlerinin çiçeklenme ve olgunluk periyotlarını nasıl etkileyeceği değerlendirilmiştir. Çalışmanın yapıldığı bölge iklim şartları ile çiçeklenme ve olgunluk parametreleri değerlendirildiğinde bu bölgeye en iyi önerilebilecek çeşidin Sarı Ulak çeşidi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Çiçeklenme, fenoloji, meyve tutumu, olgunluk, zeytin

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-7628-0676, 0000-0002-6571-5985

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 10.11.2023

Kabul Tarihi: 29.12.2023

¹Çukurova Üniversitesi, Kozan Meslek Yüksekokulu

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bahçe Bitkileri Programı

*E-posta: cansudolek.90@gmail.com

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

Introduction

The distribution area of the olive tree is between 30° and 45° latitude in both the northern and southern hemispheres. Olive is a Mediterranean climate plant characterized by dry and hot summers (Pansiot and Rebour 1964). Loussert and Brousse (1978) stated that the olive tree requires a temperature of 9-10°C in the spring development period, 14-15°C in the inflorescences period, 18-19°C in the flowering period, fertilization occurs at 21-22°C, develop around 15°C and when it reaches 18-19°C this indicates the beginning of flowering. Olive withstands the highest temperature of 40°C. In the winter rest period, the plant is damaged when the temperature drops below -7°C. The development of the olive tree, which grows in places with an average annual precipitation of 200-800 mm, depends on the distribution of the rains throughout the year. The olive is a light-loving plant (Usanmaz et al. 1988; Moltay et al. 1996; Seyran 2009).

According to the phenological calendar of the olive tree in the Mediterranean basin, March is the period when the differentiation of flower buds continues, the flower petals and male organs are formed (Kaya 2006). Pansiot and Rebour (1964) report that the resting period of olives ends in April. In April, the buds begin to open and flower clusters begin to shoot from these buds (Bozkaya 2009). The flowering period, which starts from the first week of May, continues until the middle of June. In June, olive blooming is completed and fruit setting takes place. With the increase in temperature July, the olive grains grow rapidly. In August, fruit growth continues and core hardening is observed (Varol 2006). In September olives starts to gather oil. As the temperatures decrease temperature during flowering.

Seif et al. (2015) gave information about olives in their research. A mature olive tree produces about 500,000 flowers. The number of flowers and their distribution on the inflorescences is specific to each cultivar, but can vary from year to year. Flower position on the inflorescences affects gender and opening time. Olive trees have either male or female flowers. Olive flowers are wind-pollinated; but it is also visited by insects. Critical conditions such as strong and dry winds, rain and high temperature affect pollination and can reduce fruit formation. In a year with normal flowering, 1 to 2% of flowers are sufficient to determine fruit for commercial yield.

in October, the rate of photosynthesis decreases. During this period, the olive fruit continues to be oiled and a color change is observed in the fruit. As photosynthesis activities retardation in November, olive fruit continues to turn black and maturity takes place in this month (Kaya 2006; Bozkaya 2009).

Porlingis and Voyiatzis (1999) reported that the germination of olive pollen decreases at high temperatures and early flowering in hot climate is an advantage that prevents damage to fruit set from high temperature. Galán et al. (2005) reported that the best pollination of olives is at about 20-30°C. Cultivars that bloom earlier, pollinate and fertilize at lower temperatures are safer from high temperature damage.

Seif et al. (2008) were examined the opening times of flowers, their gender and the persistence of the petal in Manzanilla, Mission and Frantoio olive cultivars. For each cultivar, 45 inflorescences were inspected each morning during the period from flowering to the shedding of the petal. Hermaphrodite flowers were fundamentally opened at the beginning of the flowering period, while the male flowers were opened later. The flower position on the inflorescences was found to have a highly significant effect on the day of blooming in all cultivars. It has been established that the position of flowers in Manzanilla and Mission cultivars has a rather significant effect on gender. In the Manzanilla cultivar, hermaphrodite flowers have significantly longer petal persistence than male flowers. According to the results of this study, the persistence of the petal depends on the daily.

In the studies made in olive, the phenological periods are determined but the observations were made subjectively. In this study, the periods for each phenology, which was formed by Sanz-Cortes et al. (2002) in detail, was given clearly that can be observed by researchers. This was carried out as a difference in the study and suggested to be usable for future studies in order to make common markers.

Materials and method

This study was carried out using Gemlik, Sarı Ulak and Domat olive cultivars in an olive orchard belonging to a producer in Mersin province, Tarsus district. The study was started at 11th year of Gemlik and 8th year of Sarı Ulak and Domat cultivars. Planting distance of the trees were 3×7.

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

The orchard was in optimal maintenance conditions and the irrigation, fertigation, pruning and protection processes were made regularly. Phenological observations of these cultivars were made.

According to Sanz-Cortés et al. (2002) the phenological observations of Gemlik, Domat and Sarı Ulak cultivars show the BBCH codes of the beginning of the inflorescences, the beginning of flowering, 25%, 50% and 75% flowering, the end

of flowering, green maturity and black maturity determined (Table 1).

In this way, the number of days after pollination in fruit maturity was also obtained. Sanz-Cortés et al. (2002) determined the following developmental stages in their research on olive phenology.

<u>Code</u>	<u>Explanation</u>
Growth phase 0:	Bud Development
00	Leaf buds on the tops of shoots that developed in the previous crop year are completely closed, sharp-pointed, stemless and coloured.
01	Leaf buds start to bulk out and new foliar primordia start to grow.
03	Foliar buds grow and separate from the base.
07	External small leaves open, but not completely separated, remaining joined at apices.
09	External small leaves opening further with their tips inter-crossing.
Growth phase 1:	Leaf Development
11	First leaves completely separated. Greenish grey colour.
15	The leaves separate further before they reach their final size. First leaves turn greenish on the upperside.
19	The leaves take their typical length and shape.
Growth phase 3:	Shoot Development
31	Shoot reach 10% of their final length.
33	Shoot reach 30% of their final size.
37	Shoot reach 70% of their final size.
Growth phase 5:	Inflorescence emergence
50	Inflorescence buds in the leaf axils are completely closed. They are sharp-pointed, stemless and ochre in color.
51	Inflorescence buds begin to swell from the bottom.
52	Inflorescence buds open. Flower cluster development begins.
54	Inflorescence buds grows.
55	Flower cluster are fully expanded. Floral buds begin to open.
57	Corolla green-coloured is longer than calyx.
59	Corolla changes colour from green to white.
Growth phase 6:	Flowering
60	First flowers open.
61	Beginning of flowering: 10% of flowers open.
65	Full flowering: at least 50% of the flowers open.
67	First petals starts to fall.
68	Most of petals fallen or faded.
69	End of blooming, fruit set, non-fertilized ovaries fallen.
Growth phase 7:	Fruit Development
71	Fruit size is approximately 10% of final size.
75	Fruit size is approximately 50% of final size. Stone begins lignified.
79	Fruit size is approximately 90% of final size. Fruit suitable for picking green.
Growth phase 8:	Maturity of Fruit
80	The fruit turns from dark green to yellowish light green.
81	Starts of fruit colouring.
85	Increasing specific fruit colouring.

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

89 Harvest maturity: fruits achieve the typical cultivar colour, remain turgid and are suitable for oil extraction.

Growth phase 9: Senescence

92 Overripe: fruits lose turgidity and begin to fall (Sanz-Cortés vd. 2002).

Results and discussion

The flowering and fruit maturity times obtained as a result of phenological observations in the olive cultivars included in the experiment are shown in table 1; The time differences of different phenological development periods according to the full flowering period are given in Table 2. The date of full flowering was accepted as 50% flowering period (Sanz-Cortés et al. 2001).

As a result of the observations made in 2017; The earliest flowering was seen in Sarı Ulak cultivar, followed by Domat and Gemlik cultivars (Table 2). The time from full bloom to maturity was 183 days of Gemlik cultivar (black maturity), 180 days of Sarı Ulak cultivar (black maturity) and 142 days of Domat cultivar (green maturity) (Table 3).

In 2018, the first bunch initiation and flowering was seen in Sarı Ulak cultivar. The flowers of the Gemlik cultivar started to bloom after a few days. On the other hand, in Domat cultivar, it was observed in the period in this trial year and flowering did not occur (Table 2). The time from full bloom to maturity was found to be 174 days in Gemlik cultivar and 171 days in Sarı Ulak cultivar (Table 3).

As a result of the observations made in 2019; inflorescences onset and flowering were observed at the earliest in the Sarı Ulak cultivar, followed by the Gemlik cultivar, and these developmental stages were realized in the latest Domat cultivar (Table 2). The period of full bloom to maturity was determined as 181 days in Gemlik cultivar (black maturity), 173 days in Sarı Ulak cultivar (black maturity) and 134 days in Domat cultivar (green maturity) (Table 3). The location of the BBCH codes of the phenological observations made in the olive cultivars included in the experiment according to the months is given in table 3.

Within the scope of phenological observations, in 2017, 2018 and 2019, the earliest inflorescences start and flowering were observed in the Sarı Ulak cultivar; The latest flowering took place in Gemlik in 2017 and 2018, and in Domat in 2019. In 2018, higher temperatures were detected in February and March compared to other years (Table 2, 3 and 4),






which brought the bunching period earlier. The earliest inflorescences onset was observed on March 30 in 2018 in the Sarı Ulak cultivar due to high temperature, while it was detected on April 2 in 2019 and on April 3 in 2017.

Barut et al. (2002) as a result of the examinations of the Gemlik olive cultivar in Bursa province, it was determined that the morphological differentiation in the buds was in the first week of February, and the emergence of the ovules in the middle of April. Bolat and Güleriyüz (1995) determined the first inflorescences formation in the Çoruh valley in the second week of May in the Butko cultivar, and stated that the first flowering in the cultivars was observed in the first week of June and the full flowering was observed in the second week of June. Since Mersin (Tarsus) shows milder conditions compared to the regions where these studies were conducted, inflorescences formation of our cultivars was observed in early April, while flowering was completed in the second week of May at the latest.

Karadağ et al. (2007) reported that the beginning of flowering was the earliest in Edincik Su and Labib (28 April), and the latest in Domat (03 May) and Erkence (06 May) cultivars. While flowering started on April 29 in Gemlik cultivar, this date was May 2 in Sarı Ulak cultivar. The end of flowering was determined as 19 May in Gemlik cultivar and 20 May in Domat and Sarı Ulak cultivars. A period of 17-20 days was observed between the beginning of flowering and the end of flowering. The flowering and fruit maturity results obtained in our study has partly similarity with the results of the researchers.

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

Table 1. Images of development periods are taken as a basis the phenological observations and shown by BBCH codes

Periods	BBCH Codes	Pictures
Beginning of inflorescence	55	
25% Blooming	63	
50% Blooming*	65	
75% Blooming	67	
End of Blooming	69	

*Full blooming, has been recognized as a 50% blooming period.

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

Table 2. Flowering and fruit maturity times determined as a result of phenological observations in the olive cultivars included in the study

Periods	BBC H Code	Domat			Gemlik			Sarı Ulak		
		2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019
Beginning of inflorescence	55	06.Apr	-	10.Apr	10.Apr	03.Apr	04.Apr	03.Apr	30.March	02.Apr
25% Blooming	63	27.Apr	-	28.Apr	30.Apr	19.Apr	26.Apr	25.Apr	17.Apr	25.Apr
50% Blooming*	65	01.May	-	03.May	04.May	24.Apr	02.May	30.Apr	21.Apr	01.May
75% Blooming	67	04.May	-	09.May	07.May	29.Apr	07.May	02.May	27.Apr	06.May
End of Blooming	69	07.May	-	14.May	09.May	02.May	11.May	04.May	01.May	09.May
Green maturity	80	20.Sep	-	14.Sep	03.Oct	12.Sep	23.Sep	29.Sep	01.Sep	20.Sep
Black maturity	88	-	-	-	05.Kas	15.Oct	29.Oct	27.Oct	05.Oct	20.Oct

Table 3. The time differences of the different phenological development periods determined in the olive cultivars used in the study compared to the full flowering period

Periods	BBCH Code	Domat			Gemlik			Sarı Ulak		
		2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019
Beginning of inflorescence	55	-24		-23	-25	-21	-27	-27	-23	-28
25% Blooming	63	-4		-5	-5	-5	-6	-5	-4	-6
50% Blooming*	65	0*		0*	0*	0*	0*	0*	0*	0*
75% Blooming	67	+3		+6	+3	+5	+6	+2	+6	+5
End of Blooming	69	+6		+11	+5	+8	+9	+4	+10	+8
Green maturity	80	+142		+134	+151	+141	+145	+152	+136	+143
Black maturity	88	-		-	+183	+174	+181	+180	+171	+173

* full bloom is considered to be "0"

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

Table 4. Placement of BBCH codes of phenological observations made in olive cultivars included in the experiment by months

	March																															April																															May																																																															
	30	31	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15																																																																															
2017																																																																																																																														
Domat																																																																																																																														
Gemlik																																																																																																																														
Sarı Ulak																																																																																																																														
																																		March																															April																															May																														
2018																																																																																																																														
Domat																																																																																																																														
Gemlik																																																																																																																														
Sarı Ulak																																																																																																																														
																																		March																															April																															May																														
2019																																																																																																																														
Domat																																																																																																																														
Gemlik																																																																																																																														
Sarı Ulak																																																																																																																														
																																		September																															October																															November																														
2017	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6																																																											
Domat																																																																																																																														
Gemlik																																																																																																																														
Sarı Ulak																																																																																																																														
																																		September																															October																															November																														
2018	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6																																																											
Domat																																																																																																																														
Gemlik																																																																																																																														
Sarı Ulak																																																																																																																														
																																		September																															October																															November																														
2019	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5	6																																																											
Domat																																																																																																																														
Gemlik																																																																																																																														
Sarı Ulak																																																																																																																														

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

Baktır et al. (1995) reported that the inflorescences formation took place between March 22 and April 4, the first flowering was on April 23 in the “Uslu” cultivar, and the last flowering was on the May 9 in the Domat cultivar. They observed that the earliest fruit maturity was on 12 December in “Uslu” and “Edincik Su” cultivars, and the latest on January 4 in “Memecik” and “Sarı Yaprak” cultivars. Toplu (2000) states that bunching begins in the first week of April; the earliest bunching was observed in “Gemlik” cultivar, and the latest in “Savrani” cultivar; reported that flowering took place in May and the flowering period lasted 11-15 days. In addition, it was determined that the number of days from full flowering to greening maturity was between 143-153 days. In this study, the time from the formation of the inflorescences to fruit set between 31-37 days on average for 3 years. The average temperature is around 20°C during flowering and pollination periods. Time from full bloom to maturity; It was found to be 183 days in 2017, 174 days in 2018 and 181 days in 2019 in Gemlik cultivar. It was determined that this period was 180 days in 2017, 171 days in 2018 and 173 days in 2019 in Sarı Ulak cultivar. According to meteorological evaluations, while the maximum temperatures were lower during the maturity period in 2017, they were higher and stable in 2018 and 2019 respectively (Table 2, 3 and 4).

Selak et al. (2013) reported that high temperatures during full bloom shortened the flowering period by 1 day in Oblica trees. Laaribi et al. (2013) found that the time from the formation of inflorescence to fruit set of Chemlali Sfax cultivar was between 35-63 days. The full bloom period was between April 3 and May 15 on average. Due to the favorable temperature increase until the last ten days of March, it has been determined that bud burst occurs early. Ay (2018) reported that the beginning of flowering occurs in the last week of April, and the full flowering period occurs in the middle of May.

Özdağ and Koyuncu (2017) reported that the formation of the inflorescences of “Çiltopak” cultivar started on March 20, and the bursting of flower buds started on April 20. Özdağ and Koyuncu (2017) have determined that the beginning of flowering is on April 15-25, the full flowering period is on May 01-07, and the end of flowering is on May 20-22. Green stage; While it was found between 13 October (Çiltopak)-20

October (Domat) in 2015, it was detected as 04 September (Çiltopak)-10 September (Domat) in 2016. The black stage period, which was 30 November in 2015, was determined as 09 October in 2016. Gemlik cultivar, the most important native olive cultivar, turned black on October 25 (Özdağ and Koyuncu, 2017).

Sanchez-Estrada and Cuevas (2019) reported that the flowering periods of Manzanilla and Barouni cultivars coincided in two years in their phenological observations in northern Mexico. In contrast to these cultivars, Sevillano trees showed slightly later flowering and a shorter overlap with the flowering time of the Manzanilla cultivar. The beginning of flowering of Manzanilla and Barouni cultivars was on March 14, full flowering was found on March 19 and flowering had ended 1 week later on March 26. The beginning of flowering in 2017 began 5 days after 2016 and ended on April 5th.

In 2017, during the flowering and pollination period, the maximum temperature average was 26.8°C, the minimum temperature average was 14°C, the average temperature was 20.3°C and the relative humidity was 63.2%. Particular attention was paid to the absence of precipitation on the days of pollination. In the fruit maturity period (BBCH: 80-85), the maximum temperature average was 27.6°C, the minimum temperature average was 16.7°C, the average temperature was 21.8°C and the relative humidity was 69.4% (Figure 1,2,3).

In 2018, during the flowering period, the maximum temperature average was 27°C, the minimum temperature average was 14.1°C, the average temperature was 20°C and the relative humidity was 66.8%. In the fruit maturity period (BBCH: 80-85), the maximum temperature average is 34°C, the minimum temperature average is 18.7°C, the average temperature is 25.5°C and the relative humidity is 61.5% (Figure 1,2,3).

In 2019, during the flowering and pollination period, the maximum temperature average was 26.9°C, the minimum temperature average was 13.7°C, the average temperature was 20.2°C and the relative humidity was 66.46%. In the fruit maturity period, the maximum temperature average was 30°C, the minimum temperature average was 17.4°C, the average temperature was

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea* L.)

22.9°C and the relative humidity was 67.1%
(Figure 1,2,3).

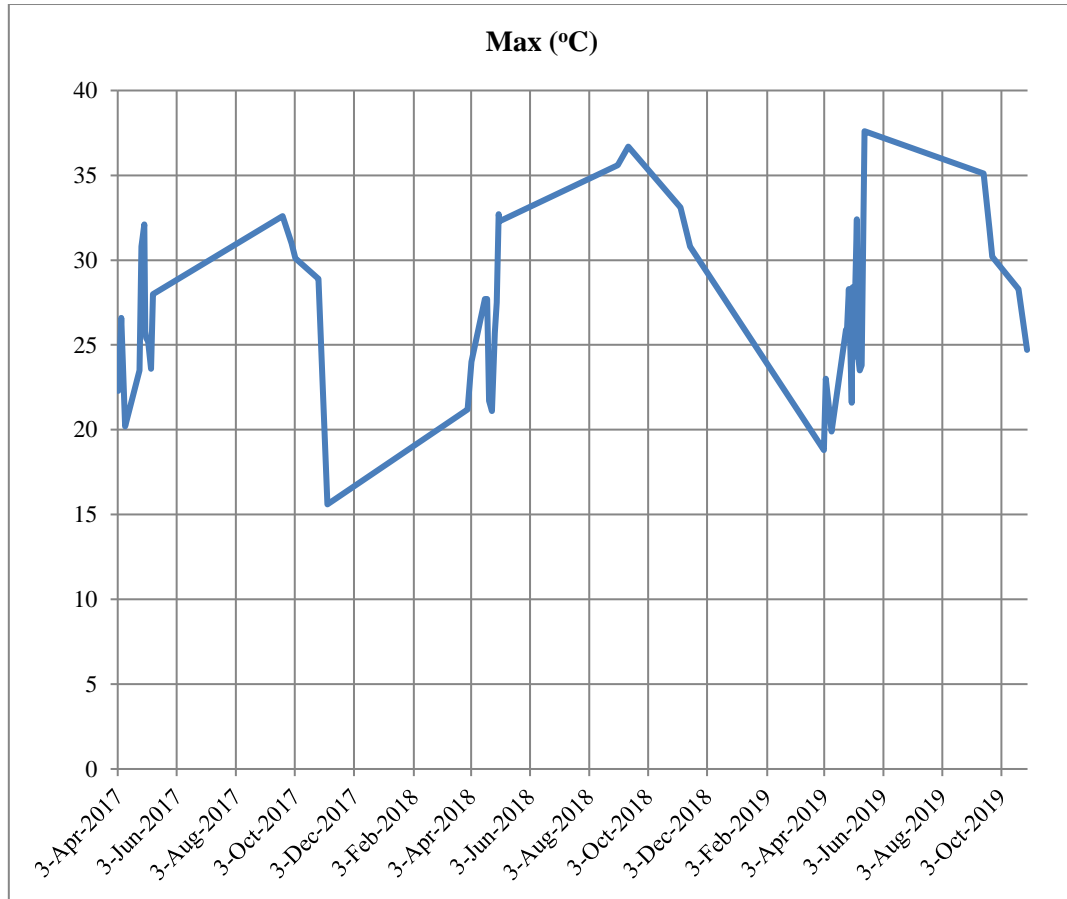


Figure 1. In 2017-2019, maximum average temperature (°C) values during the period from inflorescences to fruit maturity

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea* L.)

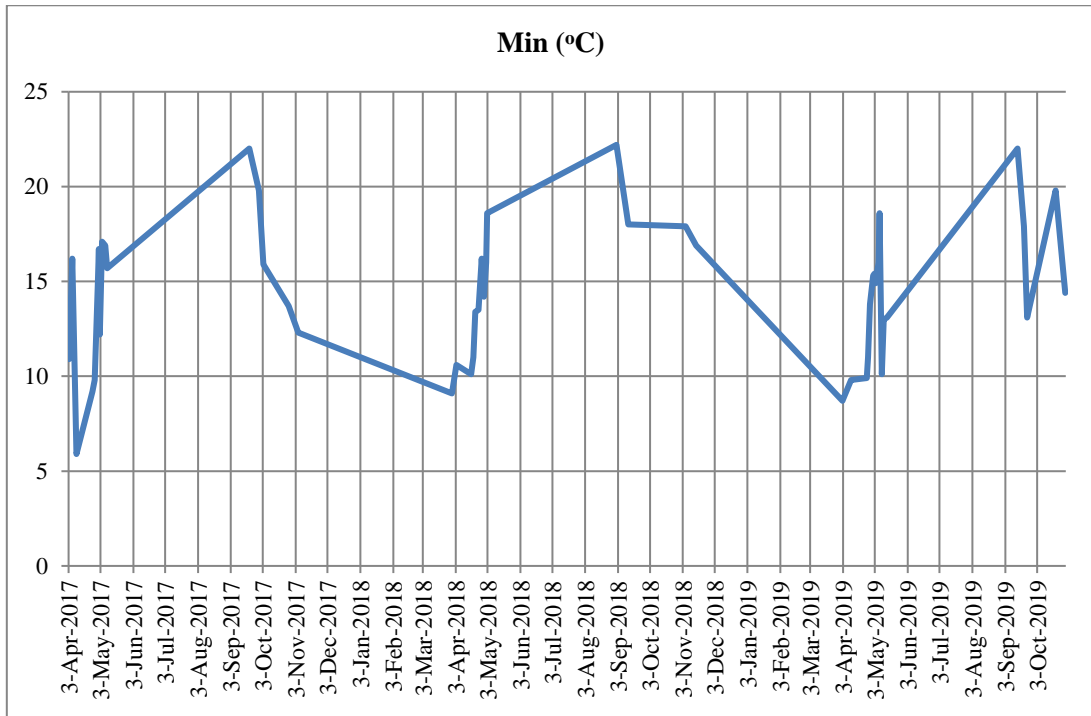


Figure 2. In 2017-2019, minimum temperature (°C) values during the period from inflorescences to fruit maturity

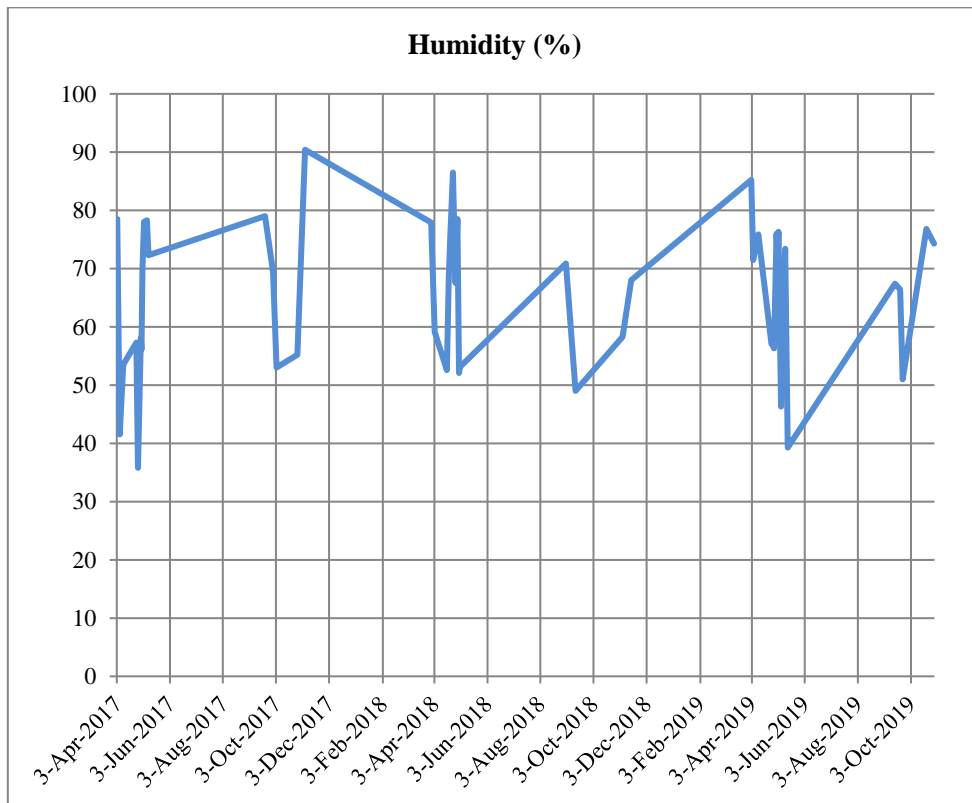


Figure 3. In 2017-2019, Relative Humidity (%) values during the period from inflorescences to fruit maturity

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea L.*)

Conclusion

The study was carried out on Gemlik, Sarı Ulak and Domat olive cultivars which are the most popular cultivars in the region, planted in the same orchard in Tarsus / Mersin Province. Phenological evaluation was made for each cultivar and its relationship with climate was tried to be revealed. As a result of the observations, the olive cultivars in question for Mersin-Tarsus-Yenice region;

- It has been found that the most suitable flowering and fertilization times are between April 15 and May 15.
- The period from the formation of the inflorescences to the fruit set between 31-37 days on average for 3 years.
- The average temperature is around 20°C during flowering and pollination periods.
- It has been determined that the period from the opening of the flowers of the cultivars to the fruit setting stage covers a period of 10 to 15 days.

According to meteorological evaluations, while the maximum temperatures were lower during the maturity period in 2017, they were observed to be higher and stable in 2018 and 2019. The indicated situation was prolonged the maturity process in 2017 and as a result, the harvest time was delayed. Apart from that, the processes were affected similarly to each other in different years. Time from full bloom to maturity;

- It was found to be 183 days in 2017, 174 days in 2018 and 181 days in 2019 in Gemlik cultivar.
- This period was determined as 180 days in 2017, 171 days in 2018 and 173 days in 2019 in Sarı Ulak cultivar.
- In the Domat cultivar, it was determined that there were 142 days in 2017 and 134 days in 2019.

Two factors that should be taken into account during flowering and fruit keeping periods for the Mersin region are high temperature and relative humidity. Especially in 2017, the decrease in temperatures up to 5 degrees at the beginning of somaklama shows that low temperature is a risk factor, although it does not create a risk for the Mersin region. The minimum temperatures of 5.9-22.2 degrees, the maximum temperatures of 15.6-37.6 degrees and the relative humidity of 35.8-90.4% have been evaluated as suitable values for fruit set. When the climate conditions with flowering and maturity

parameters were evaluated together, the best suggestable cultivar for relevant region is became Sarı Ulak. This study will create an example for phenological evaluations of different cultivars using BBCH codes. In the studies made in olive, the phenological periods are determined but the observations were made subjectively. In this study, the periods for each phenology, which was formed by Sanz-Cortes et al. (2002) in detail, was given clearly that can be observed by researchers. This was carried out as a difference in the study and suggested to be usable for future studies in order to make common markers.

Acknowledgements

This study was produced from the PhD thesis of Researches On Reproductive Biology of Gemlik, Sarı Ulak and Domat Olive Cultivars. Authors are grateful to Barış Gürbüz for providing plants.

This work was supported by Ankara University Scientific Research Projects [Project number 18L0447008].

References

- Baktır İ, Salman A ve Ülger S (1995). Yerli ve yabancı orijinli bazı zeytin çeşitlerinin Antalya koşullarında büyüme ve gelişme özelliklerinin saptanması üzerine araştırma. Türkiye Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 3-6 Ekim 1995, 1; 701-705, Adana.
- Barut E ve Ertürk Ü (2002). Gemlik Zeytin Çeşidinde Çiçek Tomurcuğu Farklılaşması ve Gelişimi Üzerine Bir Araştırma. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 16: 29-35.
- Bolat İ ve Güleryüz M (1995). Çoruh vadisinde yetiştirilen zeytin çeşitlerinin bazı pomolojik özelliklerinin incelenmesi üzerine bir araştırma, Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 3-6 Ekim, Cilt 1, 2736 s., Adana.
- Bozkaya F (2009). Dolu Yılında Zeytin (*Olea Europaea L.*) Bitkisinde Mineral Bitki Besin Maddelerinin Mevsimsel Değişiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Galán CH, García-Mozo L, Vázquez L, Ruiz C, Díaz de la Guardia M and Trigo M (2005). Heat requirement for the onset of the *Olea europaea L.* pollen season in several sites in Andalusia and the effect of

Phenological Growth Stages of Some Olive Cultivars (*Olea europaea* L.)

- the expected future climate change. *Inter. J. Biomet.* 49; 184-188.
- Karadağ S, Yaman A, Tahtacı SA, Ulusaraç A ve Aksu Ö (2007). Güneydoğu Anadolu Bölgesinde Zeytinde Adaptasyon. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Yayın No: 23. <http://arastirma.tarim.gov.tr/afistik/Belgeler/Taranan%20yay%C4%B1nlar/gda%20zeytin%20adaptasyonu%20yay%C4%B1n%20no%2023%20001.pdf>. Erişim Tarihi: 10.03.2019.
- Kaya Ü (2006). Zeytinde Üretim Metodları, Ankara.
- Laaribi I, Mezghani MA and Mars M (2013). Study of the Floral Phenology and of six olive Inflorescence Characteristics of Selections of Olive obtained by Controlled Pollination in Relation to Climatic Conditions. *ARPN Journal of Science and Technology.* 3(8).
- Loussert R and Brousse G (1978). *L'Oliver, Coll, Techniques Agricoles et Production Mediteraneennes, G.P. Maisonneuve et Larouse Ed Paris.*
- Mehri H, Mehri-Kamoun R, Msallem M and Faïdi A (2003). Reproductive behaviour of six olive cultivars as pollenizer of the self-incompatible olive cultivar Meski. *Adv. Hort. Sci.*, 2003 17(1); 42-46.
- Moltay İ, Sütçü AR, Yürektürk M ve Çetin H (1996). Zeytin yetiştiriciliği ve değerlendirilmesi. Tarımsal Araştırmaları Destekleme ve Geliştirme Vakfı Yayın No: 28, 74 s; Yalova.
- Özdağ AN ve Koyuncu F (2017). Karaman Yöresinde Yetiştiriciliği Yapılan "Çiltopak" Zeytin Çeşidinin Fenolojik Morfolojik Ve Pomolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Pansiot FP and Rebour N (1964). (Çev. Aksu, S. ve Kantar, M.), Zeytincilikte Gelişmeler, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, Yayın No. 3, Bornova/ İzmir.
- Porlingis IC and Voyiatzis DG (1999). Paclobutrazol decreases the harmful effect of high temperatures on fruit set in olive trees. *Acta Hort.* 474; 241-244.
- Sanchez-Estrada A and Cuevas J (2019). Pollination Strategies to Improve Fruit Set in Orchards of 'Manzanillo' Olive in a Nontraditional Producing Country, Mexico. *American Society for Horticultural Science. Volume 29 (2019): Issue 3 (Jun 2019). Page: 258–264.*
- Sanz-Cortés F, Martínez-Calvo J, Badenes ML, Bleiholder H, Hack H, Llacer G and Meier U (2002). Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea* L.). *Annals of Applied Biology*, 140 (2); 151-157.
- Seifi E, Guerin J, Kaiser B and Sedgley M (2008). Inflorescence architecture of olive. *Scientia Horticulturae* 116; 273–279.
- Seifi E, Guerin J, Kaiser B and Sedgley M (2015). Flowering and fruit set in olive: a review. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 5(2).
- Selak VG, Perica S, Ban SG and Poljak M (2013). The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae* 156; 38-46.
- Seyran Ö (2009). Silifke Yağlık, Sarı Ulak ve Gemlik Zeytin Çeşitlerinin Meyve Gelişim Sürecinde Gösterdikleri Bazı Fizyolojik, Morfolojik ve Biyokimyasal Değişimler. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay.
- Toplu C (2000). Hatay İli Üretim Merkezlerindeki Zeytinliklerin Verimlilik Durumları, Fenolojik, Morfolojik ve Pomolojik Özellikleri ile Beslenme Durumları Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Usanmaz D, Canözer Ö, Özahçı E (1988). Zeytinlerde soğuk zararları ve alınacak önlemler. Zeytincilik Araştırma Enst. Yayın No: 41, s. 24, Bornova/İzmir.
- Varol N (2006). Zeytinde Periyodisite. Zeytin Yetiştiriciliği. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü. Yayın No:61, İzmir.



Araştırma Makalesi

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri

Cemile KAPLAN*¹, Şenay KARABIYIK², Dicle DÖNMEZ³, Öznur ÇETİN¹, Nurengin METE¹, Özhan ŞİMŞEK⁴, Yıldız AKA KAÇAR⁵

ÖZ

Çalışmanın amacı, kendine uyuşur 'Saurani', yarı uyuşur 'Sarı ulak' ve kendine uyuşmaz 'Kilis yağlık' zeytin çeşitlerinde eşeyssel uyuşmazlık belirtilerinin ve zamanının belirlenmesi ayrıca iki farklı tozlama çalışmaları olan 'emaskülasyon sonrasında kendileme' ve 'kese sallama yöntemi ile kendileme' uygulayarak kullanılabilecek tozlama yöntemlerinin karşılaştırılması planlanmıştır. Çalışma sonucunda, kendine uyuşmaz 'Kilis yağlık' ve yarı uyuşur 'Sarı ulak' çeşitlerinde uyuşmazlık belirtilerinin özellikle tozlamadan sonraki 36. saatte görülmeye başladığı, kendine uyuşur 'Saurani'de ise 36. saatte çiçek tozu çim borularının tohum taslağına ulaştığı tespit edilmiştir. Yapılan farklı tozlama uygulamaları açısından ise uyuşmazlığın başlangıç zamanının belirlenmesi amacı ile yapılacak hassas çalışmalarda emaskülasyon sonrasında tozlama işleminin kullanılması şart iken, sadece durum belirlemesi üzerine yapılacak çalışmalarda kese sallama yönteminin yeterli olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Eşeyssel uyuşmazlık, Oleaceae, Emaskülasyon, Tozlama, Çiçek tozu

Determination of Sexual Incompatibility Case and the Availability of Pollination Methods for Incompatibility Research in Olive

ABSTRACT

In this study, it was planned to determine the symptoms and timing of sexual incompatibility in self-compatible 'Saurani', semi-incompatible 'Sarı ulak' and self-incompatible 'Kilis yağlık' olive cultivars and to compare the pollination methods that can be used by applying two different pollination studies, 'selfing after emasculation' and 'selfing with bag shaking method'. As a result of the study, it was determined that incompatibility symptoms started to appear especially at the 36th hour after pollination in the self-incompatible 'Kilis yağlık' and semi-incompatible 'Sarı ulak' varieties, while in the self-compatible 'Saurani', pollen tubes reached the ovule at the 36th hour. Regarding the different pollination practices, it was concluded that pollination after emasculation should be used in sensitive studies to determine the onset time of incompatibility, whereas the bag shaking method would be sufficient for studies to determine only the status.

Keywords: Sexual incompatibility, Oleaceae, Emasculation, Pollination, Pollen grain

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-6904-6021, 0000-0001-8579-6228, 0000-0002-7446-9405, 0000-0003-4252-0357, 0000-0003-4357-8614, 0000-0001-5552-095X, 0000-0001-5314-7952

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 17.11.2023

Kabul Tarihi: 30.12.2023

¹ Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

² Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümü

³ Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi

⁴ Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü

⁵ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü

*E-posta: cemilekaplan@windowslive.com

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri

Giriş

Her geçen gün artan nüfus, değişen ekonomik kaynaklar ve dünyada yeni tat arayışı gibi farklı sebepler zeytin ve zeytinyağına olan ilgiyi artırmıştır. Zeytin ağacı (*Olea europaea L.*), Akdeniz iklimine adaptasyonu ile bilinen Akdeniz Havzasında kültürle bütünleşmiş eski geleneksel bir üründür. Ancak geleceğe yönelik tahminlerde iklim değişikliğinin etkilerinde Akdeniz Havzası “sıcak nokta” olarak kabul edilmekte, iklim değişikliğinin zeytin üretiminde önemli sorunlara yol açacağı tahmin edilmektedir (Fraga ve ark., 2021). Sınırlı ekolojik alanda yetiştiriciliği yapılan zeytin bitkisi, büyüyen iklim krizi sonucu oluşan olumsuz çevre koşullarına rağmen, birim alanda daha fazla verim elde etmek ve daha kaliteli üretim için bitkiyi her yönüyle tanımak son derece önemlidir.

Zeytin bol çiçekli bir ağaç olmasına rağmen açan çiçeğe oranla çok az sayıda meyve oluşturur. Zeytinlerde hermafrodit (iki eşeyli) ve staminate (erkek) olmak üzere iki tip çiçek bulunmaktadır. Hermafrodit çiçek antesis döneminde yaklaşık 4-5 mm uzunlukta, pistil ve anterler ise neredeyse aynı boyda yaklaşık 2.5 mm uzunluktadır. Dişi organ en üst kısmını oluşturan stigma yaklaşık 1 mm, stil yaklaşık 0.5 mm ve ovaryum 1-1.2 mm çapında çok küçük yapıda olup (Serrano ve ark., 2008), stil kısmının kısa olması sayesinde çiçek tozu çim borusunun yumurtalığa ulaşımı kısa sürede meydana gelmektedir. Zeytin bitkisi hermafrodit çiçekte ve staminate çiçekte meydana gelen çiçek tozlarından dolayı çiçek tozu üretimi açısından tozlamada önemli bir kaynak olmasına rağmen bazı genotiplerde dölleme sorunları yaşamaktadır (Reale ve ark., 2006). Aynı zeytin çeşidine ait çiçek tozlarının bir kısmı uyuşur durum gösterirken, bazı çiçek tozu çim borularının stilde çok az mesafe kat edebildiği tespit edilmiştir (Bartolini ve Guerriero, 1995). Çiçek tozu çim borusu büyümesi üzerine sıcaklık, nem, bitkinin yaşı gibi çevresel faktörlerin önemli etkisi olsa da çiçek tozu çim borusunun gelişimini engelleyen sebeplerden biri de eşeyssel uyuşmazlıktır. Eşeyssel uyuşmazlık, bir çiçekte eşey organları ve eşey hücreleri sağlıklı geliştikleri halde, kendilemede veya değişik tozlayıcılarla yabancı tozlanma ve melezlemeler sonucunda dölle-

menin gerçekleşmemesi durumudur. Dölleme gerçekleşmediği için normal koşullarda tohum ve dolayısıyla meyve de oluşamaz. Eşeyssel uyuşmazlık özelliği gösteren çeşitlerde ise mutlaka yabancı tozlanmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Eşeyssel uyuşmazlık kalıtsal yünden birden fazla lokusun etkisi ile meydana gelmektedir (Franklin-Tong, 2008).

Kendine uyuşmazlık, birçok çiçekli bitkide olduğu gibi zeytinde de tür içi genaratif çoğalmayı engelleyen bir mekanizmadır. Aynı zamanda, kendi çiçek tozuyla meyve oluşumunu engellediği için verimde azalmaya ve önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu durum tek çeşit ile kurulmuş kapama bahçelerde meyve üretiminde azalma ve önemli oranda ürün kaybına (Quero ve ark., 2002) sebep olmakla birlikte ıslah çalışmalarını da etkileyen önemli bir faktördür.

Kendine uyuşur çeşitlerde çiçek tozu çim borusu hızlı bir şekilde ilerlerken, kendine uyuşmazlık özelliği gösteren çeşitlerde ise çiçek yaşamı süresince çiçek tozu çim borusunun büyümesi çok yavaş gelişmektedir. Bazı durumlarda ise generatif çekirdek mikropile ulaşmadan pistilde fizyolojik sınırlamalar getirerek tamamen büyümeye engel olmakta ve dölleme olayı gerçekleşmemektedir. Bu durumda çiçekler dökülerek ömrünü tamamlamaktadır (Rea ve Nasrallah, 2004). Kendine uyuşmazlıkta çiçek tozunun çim-lenmesi ve çiçek tozu çim borusundaki gelişiminin bilinmesi gelecekte yapılacak çalışmalar için önemli bir kaynak sağlayacaktır. Bu çalışmada, Ulusal Zeytin Arazi Gen Bankasında yer alan tescilli çeşitler olan Kilis yağlık, Sarı ulak ve Saurani zeytin çeşitlerinde eşeyssel uyuşmazlık durumları ve uyuşmazlık belirtilerinin histolojik olarak ne şekilde gerçek-leştiği ile uyuşmazlık zamanının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, eşeyssel uyuşmazlık çalışmalarında bitkinin uyuşmazlık durumunun belirlenmesi sırasında kullanılabilecek tozlama yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Materyal

Bu çalışma 2022 yılında zeytin çiçeklenme periyodunda Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir ve Çukurova Üniversitesi Sitoloji ve Histoloji Laboratuvarında, Adana yürütülmüştür. Çalışmada kendine uyuşmaz 'Kilis yağlık', yarı uyuşur 'Sarı ulak' ve kendine uyuşur 'Saurani' zeytin çeşitleri kullanılmıştır. Kilis Yağlık çeşidinin orijini Kilis olup Gaziantep, Oğuzeli, Şanlıurfa, Cizre, Kahramanmaraş ve Mardin illerindeki zeytinliklerinde yoğun olarak bulunur. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin toplam ağaç sayısının yaklaşık yarısı 'Kilis Yağlık' çeşidinden oluşur. Ağacın gelişimi hızlı olup orta büyüklükte yayvanca taç oluşturur. Meyveleri aynı boyutta olmaz, irili ufaklı meyveler oluşturur ve yuvarlaktır. Bazı yıllar da salkım şeklinde meyve oluşumu görülür. Bu çeşidin en önemli sorunu boncuklu meyve oluşumudur (Mete ve Çetin, 2017). Meyveleri çok küçük, çekirdekleri meyveye oranla iridir. Meyveleri %31,8 oranında yağ içermesiyle yağlık olarak değerlendirilir. Kuvvetli periyodisite gösterir. Soğuğa çok duyarlı değildir. Çelikle ve yumru ile çoğaltılır. Kendine uyuşmaz bir çeşittir (Kaya ve ark., 2015). 'Sarı Ulak' çeşidinin orijini Mersin ilinin Tarsus ilçesidir. Mersin, Tarsus, Erdemli, Gülnar, Adana'nın Seyhan, Kozan Yumurtalık ilçelerinde yoğun olarak yetiştirilmektedir. Tarsus menşeli Akdeniz Bölgesi ağaç varlığının %6'sını oluşturur. Ağacı kuvvetli, büyük, yayvan dağınık bir taç oluşturur. Meyveleri orta irilikte uzun ve silindirik, ucu yuvarlak ve memesizdir. Çekirdekleri çok iri olup %19 civarında yağ içerir. Verimi orta düzeyde siyah ve yeşil olarak değerlendirilir. Soğuklardan

kolay etkilenir, sıcaklığın kritik seviyeye düşmesi durumunda sürgün, ince dal ve dalcıklarda çatlama ve meyvelerde soğuktan dolayı hurma oluşumu görülür. Kendi ekolojisinde aile ihtiyacını karşılamak için yeşil ve siyah sofralık olarak değerlendirilir. Periyodisite gösterir. Çeliklerin köklenme oranı orta seviyededir. Kısmen kendine uyuşur bir çeşittir (Kaya ve ark., 2015). 'Saurani' ise Hatay'ın Altınözü İlçesi ve civarında yoğun olarak görülen bir çeşittir. Meyve ve çekirdekleri küçük olup %29,2 oranında yağ içerir. Meyve ucu aşağı doğru bükülmüş olup uça küçük bir meme bulunur. Oldukça verimli bir çeşittir. Periyodisite gösterir ve genellikle geç olgunlaşır. Düşük sıcaklıktan zarar görür. Yağ içeriği yüksek olduğundan genellikle yağlık olarak değerlendirilir. Ayrıca, aile ihtiyaçlarını karşılamak için yeşil ve siyah sofralık olarak kullanılır. Aşı ile çoğaltılır. Kendine uyuşur bir çeşittir (Kaya ve ark., 2015).

Yöntem

Tozlama Çalışmaları

Tozlama çalışmaları için öncelikle tozlama yapılan dallarda çiçek tomurcukları henüz açılmamışken tozlanmayı önlemek amacıyla yağlı kağıtlardan yapılmış izolasyon keseleri ile kapatılarak tozlama zamanına kadar izole edilmesi sağlanmıştır. Bu kapsamda her çeşitten en az 40 adet dal kapatılmıştır (Şekil 1A). Çiçek tozu elde etmek amacıyla tozlama için ayrılmış olan ağaçlardan ayrı ağaçlara çiçek tozu elde etmek amacıyla keseler takılarak gün aşırı keselerin sallanması ile çiçek tozları elde edilmiştir. Toplanan çiçek tozları her çeşit için ayrı ayrı küçük kutular içerisine alınmış (Şekil 1B) ve tozlama çalışmasında kullanılabilecek kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Tozlamada kullanılan çiçek tozlarının elde edilmesi. A. Dallara yağlı kağıtların takılması. B. Tozlamada kullanılan çiçek tozları

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri

İzolasyon yapılan dallarda zeytinlerde tozlama amacıyla kullanılan 2 farklı tozlama işlemi (**Emaskülasyon Sonrasında Tozlama ve Kесе Sallama Yöntemi ile Tozlama**) yapılmış olup, farklı şekillerde örnekler alınmıştır.

Emaskülasyon Sonrasında Tozlama ve Örnekleme

Kullanılan çeşitlere ait çiçek tomurcukları beyaz balon aşamasında iken taç yapraklar ve erkek organların ince uçlu pensler yardımıyla çiçekten emasküle edilmesinden sonra (Şekil 2A) her

çeşit için kendi çiçek tozunun bir samur fırça yardımıyla dişi organ tepesi (stigma) üzerine taşınarak tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2B). Ardından tozlanması yapılan dallar tozlanma ve dölleme sırasında dışarıdan gelecek çiçek tozlarından korunması amacıyla agril torbalar ile izole edilmiştir (Şekil 2C). Emaskülasyon sonrasında elle tozlama işlemi için histolojik çalışmalarda kullanılacak örnekler tozlama işleminden 2, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 saat sonrasında alınmıştır.



Şekil 2. Elle tozlama işlemlerinin yapılması. A. Balon aşamasındaki çiçeklerde emaskülasyon işleminin yapılması. B. Çiçek tozlarının fırça ile dişik tepesine taşınması. C. Tozlanmış dalların izolasyonu.

Kese sallama yöntemi ile tozlama ve örnekleme

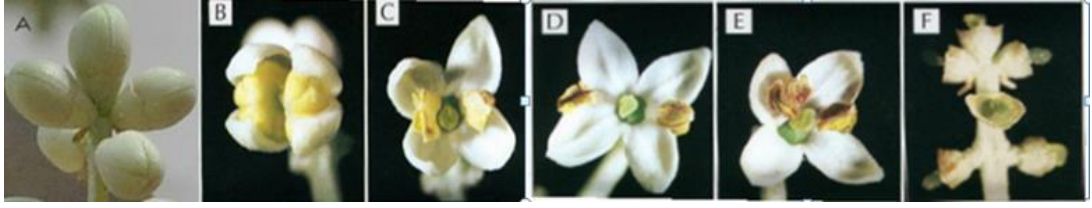
Tozlama işlemleri için önceden izole edilmiş dallarda çiçeklerin %25 oranda açtığı dönemde keselerin birer kere sallanması ile kendileme işlemleri yapılmıştır (Şekil 3). Örnekleme, tozlama işleminden sonra dört gün boyunca tamamen gözleme dayalı olarak “Taç yapraklar

hafif açıldığında”, “Taç yapraklar tam açıldığında”, “Anterlerin bir kısmı patlamış”, “Anterlerin tamamı patlamış”, “Anterler kararmış”, “Sadece dişi organ kalanlar” olacak şekilde farklı aşamalarda çiçek örnekleri alınmıştır (Şekil 4 A-F).



Şekil 3. Dalların sallanması yöntemiyle tozlama işleminin yapılması. A. Çiçeklerin %25'inin açtığı dönem. B. Dalların sallanması.

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri



Şekil 4. Tozlama işlemi sonrasında gözleme dayalı örnek alınımında temel alınan çiçek durumları (Lavee ve ark., 1996). A. Balon aşaması. B. Taç yaprakları hafif açılmış çiçek, C. Anterlerinin bir kısmı patlamış çiçek, D. Anterlerinin tamamı patlamış çiçek, E. Anterleri kararmış çiçek, F. Sadece dışı organı kalan çiçek

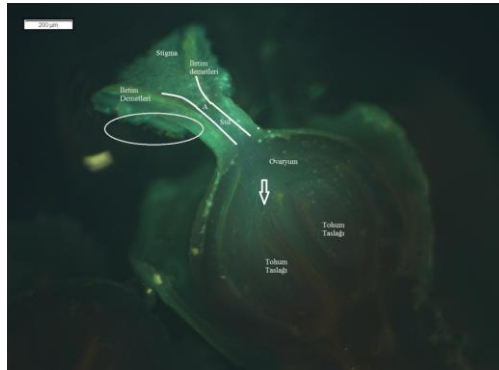
Histolojik Analizler

Her iki uygulama yönteminde belirlenen örnekleme zamanları için ayrı ayrı olacak şekilde 10 örnek alınmış ve hızlıca laboratuvara getirilerek FPA70 fiksasyon sıvısı içerisine aktarılmıştır. Alınan örneklerde çiçek tozu çim borusu gelişimlerinin incelenmesi amacıyla “Ezme preparat yöntemi” kullanılmıştır. Bu kapsamda alınan örnekler FPA’dan arındırılmak için yıkanmış, ardından 8N NaOH ile yumuşatıldıktan sonra K_3PO_4 ile mordanlanmış Anilin mavisi ile boyanmıştır (Karabıyık, 2022). Boyama işleminin tamamlanmasından sonra Olympus BX 51 floresan mikroskop ile incelenen örneklerde DP72 kamera ile görüntüleme yapılmıştır. İnceleme esnasında çiçek tozu çim borularının stigma üzerinde çimlenmesi, stil içerisinde ilerlemesi ile yumurtalığa ulaşma durumları tespit edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Zeytinde Pistilin Anatomik Yapısı ve Çiçek Tozu Çim Borusu Gelişimi

Zeytin bitkisine ait pistilde geniş bir stigma, kısa bir stil ve irice bir ovaryum bulunmaktadır. Ovaryum içerisinde anatrop yapıda ve mikropilleri iç kısma bakan 4 adet tohum taslağı bulunmaktadır. İletim demetleri çiçeği çiçek sapından stigmanın ucuna kadar iki taraftan çepeçevre sarmaktadır. Stilde bulunan iki iletim demeti öbeği arasında çiçek tozu çim borusu büyüme dokusu bulunmaktadır. Çiçek tozu çim boruları stigmada çimlendikten sonra bu doku içerisinde ilerleyerek en kısa yoldan tohum taslağına giriş yapmaktadır (Şekil 5). Yapılan incelemeler sonucunda her üç çeşitte de bu yapıda farklılıklar olmadığı ancak pistillerin stigma iriliklerinde farklılıkların olduğu belirlenmiştir.



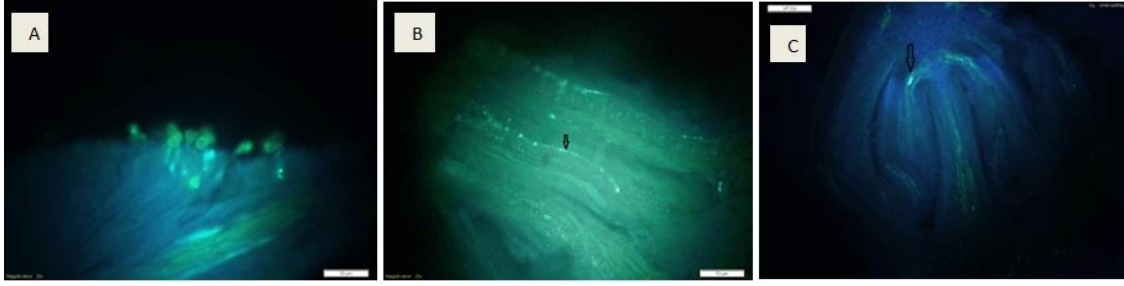
Şekil 5. Bir zeytin pistilinin boyuna kesilmiş görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200µ.

Şekil üzerinde A ile belirtilmiş bölge çiçek tozu çim borusu büyüme dokusunu, Beyaz ok; çiçek tozlarının tohum taslağına giriş yerini, Yuvarlak içine alınmış bölge; stigmada çimlenmekte olan çiçek tozlarını göstermektedir.

Zeytinde çiçek tozu çim boruları stigmaya ulaştıktan 2-6 saat sonra oluşmaya başlamıştır (Şekil 6A). Başlangıçta stigma üzerinde çok sayıda çiçek tozu çim borusu uzamaya başlasa da

stil içerisine az sayıda çiçek tozu çim borusunun giriş yaptığı (Şekil 6B) ve bu çim borularından da sadece 1-4 tanesinin tohum taslaklarına kadar uzayabildiği (Şekil 6C) görülmüştür.

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri



Şekil 6. Zeytinde çiçek tozu çim borusu uzaması. A. Çiçek tozu çim borularının stigma üzerinde çimlenmesi, ölçek çubuğu: 50µ. B. Çiçek tozu çim borusunun (siyah ok) stil içerisinde ilerlemesi (Siyah ok), ölçek çubuğu: 50µ. C. Çiçek tozu çim borusunun tohum taslağına ulaşması (Siyah ok), ölçek çubuğu: 100µ.

Daha önce yapılan çalışmalarda da zeytinde çiçek tozu çim borusunun stigma üzerine ulaştıktan sonra iki iletim demeti arasından stil içerisinde bulunan dokuya nüfuz etmekte ve başlangıçta çok sayıda çiçek tozu çim borusu gelişimi sağlanırken oluşan çiçek tozu çim borularından ancak 1-2 tanesi ovaryuma ulaşabilmekte olduğu belirtilmiştir (Cuevas ve ark., 1993; Ateyyeh ve ark., 2000; Vuletin Selak ve ark., 2014). Bazı çalışmalarda ovaryuma ulaşan çiçek tozu çim borusu sayısının 4 taneye ulaşabildiği de bildirilmiştir (Wu ve ark., 2002). Yaptığımız bu çalışmada da benzer sonuç her iki tozlama yöntemi ile de yapılan histolojik analizler sonucunda kendine uyuşur ‘Saurani’ zeytin çeşidinde tespit edilmiştir.

Tozlamalar Sonrasında Çiçek Tozu Çim Borusu Gelişimi ‘Saurani’

Emaskülasyon sonrasında elle tozlama çalışmalarında yapılan histolojik incelemeler sonucunda kendine uyuşur ‘Saurani’ zeytin çeşidinde çiçek tozu çim borularının tozlamadan 2 saat sonrasında itibaren stigma üzerinde çimlenmeye başladığı (Şekil 7A), 24. saatte stil içerisinde ilerlemekte olduğu (Şekil 7B) ve 36. saatte ovaryuma ulaştığı belirlenmiştir (Şekil 7C). Kese sallama yönteminde ise ‘Saurani’ çeşidinden alınan örnekler arasında anterleri patlamış ve anterleri kararmış olan örneklerde çiçek tozu çim borusunun tohum taslağına ulaştığı belirlenmiştir. Tarsus koşullarında Gemlik, Sarı Ulak ve Domat zeytin çeşitlerinde yapılan bir çalışmada çiçek tozu çim borularının tohum taslağına ulaşması hem

kendileme hem de yabancı tozlama uygulamalarında 2 veya 3. günde gerçekleştiği bildirilmiştir (Gencer, 2020). Arzani ve Javady (2000), ise zeytinde etkili tozlanma periyodunu belirlemek amacıyla çiçekler henüz beyaz balon aşamasındayken emaskülasyon işlemi uygulanarak tozlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, çiçek tozu çim borularının tozlamadan 1 gün sonra stile, 3 gün sonrasında ise tohum taslağına ulaştığı görülmüştür.

‘Kilis Yağlık’

Kendine uyuşmaz olarak bilinen ‘Kilis yağlık’ zeytin çeşidinde elle tozlama çalışmaları sonucunda çiçek tozu çim borularının tozlamadan sonraki 6. ve 12. saatlerde stigmada çimlenmeye başladığı, ilk 24 saat içerisinde çiçek tozu çim borularının kendi boyutunun yaklaşık 4 katı kadar uzadığı belirlenmiştir (Şekil 7D). Tozlanmadan sonraki 36. saatte ise çiçek tozu çim borularının uç kısımdan şişmeye veya çatallanmaya başladığı, bazılarının ise stil dokusuna giremeyerek stigma üzerinde dönmeye başladığı belirlenmiştir (Şekil 7E). Bu durum ‘Kilis yağlık’ çeşidinde çiçek tozu çim borularının stigmayı delemeyen deformasyona uğradığını, yani uyuşmazlık belirtilerinin stigma üzerinde 36. saatten itibaren başladığını göstermektedir. Söz konusu çeşitte kese ile sallama yönteminde ise anterleri yeni patlamış olan örneklerde çiçek tozları çimlenmeye başlamış olup, anterler kararmış olan bazı örneklerde ve sadece dişi kalan örneklerde çiçek tozu çim borularında kıvrılmalar başladığı tespit edilmiştir.

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri

East (1934), kendine uyuşmazlığı kendileme depresyonu (artan homozigotluk nedeniyle bireylerdeki performans azalması) olarak tanımlamakta ve uyuşmazlık durumunda çiçek tozu çim borusunda kıvrılmalar ve uç kısımlarda şişmeler olduğu, belirli bir süre sonra çiçek tozu çim borusu büyümesinin durdurulduğunu bildirmiştir. Benzer durumlar kendine

‘Sarı Ulak’

Kendine yarı uyuşur olan ‘Sarı ulak’ zeytin çeşidinde ise çiçek tozlarının tozlamadan sonraki ilk saatlerden itibaren çim borularını oluşturmaya başladığı gözlenmiştir. Tozlamadan 24 saat sonra çiçek tozu çim borularının stigmadan içeriye giriş yapmış olduğu ve özellikle 36. saatte tohum taslağının yarısına kadar ulaştığı görüntülenmiştir. Söz konusu çeşitte 48. saatte tohum taslağına ulaşmış çiçek tozu çim borularının da olduğu görülmüştür. Bu durum ‘Sarı Ulak’ çeşidinde kendileme sonucunda meyve tutumunun bu şekilde gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

‘Sarı Ulak’ yarı uyuşur bir çeşit olduğundan bazı çiçekler kendileme sonucunda meyve oluştururken, bazı çiçeklerde de çiçek tozu çim borularının engellenmesi beklenmektedir. Emaskülasyon sonrası tozlamada başlangıçta çiçek tozu çim boruları normal şekilde ilerlerken 60. saatte çiçek tozu çim borularının stilin yarısında parçalanmaya başladığı ve dolayısıyla bu çiçek tozu çim borularının tohum taslaklarına ulaşamadığı görülmüştür (7F-H). Bazı durumlarda çiçek tozu çim boruları ovaryum içinde de yüksek kalloz ve kıvrılmalar göstermiştir (Şekil 7F-H). Ancak bazı örneklerde de stilde ilerlemekte olan çiçek tozu çim borularından bir kaçının ovaryuma doğru ilerlediği ve tohum taslağına ulaşabildiği de görüntülenmiştir (Şekil 7C). Bu durum S genlerinin yarısının benzerlik göstermesinden

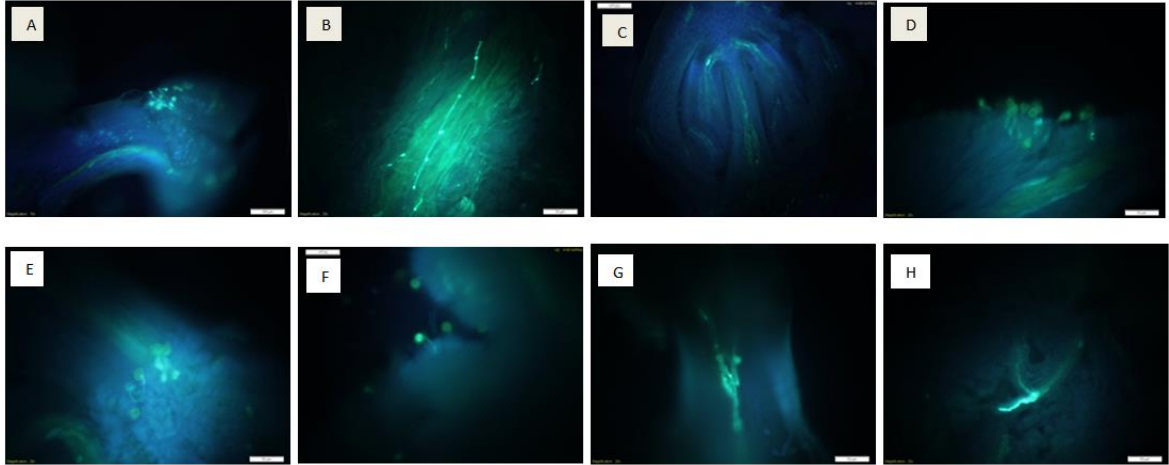
uyuşmazlık gösteren Frantoio, Koroneiki ve Kalamata zeytin çeşitleri üzerinde yapılan çalışma sonucunda da gözlenmiş olup, çiçek tozları çim borularının stile girmeden önce stigmada engellendiği tespit edilmiştir (Seifi ve ark., 2011).

kaynaklı olduğu düşünülmekte ve dişi organ ile benzer S genine sahip çiçek tozlarına ait çiçek tozu çim borularının stil içerisinde parçalandığını işaret etmektedir. Nitekim Dölek-Gencer ve ark. (2023), Sarı ulak zeytin çeşidinde çiçek tozu kalite ve miktarı yüksek olmasına rağmen kendileme uygulamasında en yüksek düzeyde boncuklu meyve oluşumunu gerçekleştirdiği ve bu durumun çeşidin kendi çiçek tozu ile uyuşmazlık sorunu yaşadığından kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Kese sallama yöntemi ile yaptığımız çalışma sonucunda ise ‘Sarı Ulak’ çeşidinde başlangıçtaki örneklerde çiçek tozu çim boruları normal ilerlemeye devam ederken sadece dişi organı kalan örneklerde çiçek tozu çim borularının stilin ortasında deforme olmaya başladığı belirlenmiştir.

Manzanillo zeytin çeşidinin kendi çiçek tozu ile tozlanması sonucunda çiçek tozu çim borularının çoğunun stigma yüzeyinde kaldığı ve stil kısmına ulaşamadığı, bu durumda çiçeklerin ancak %5’inde döllenme gerçekleştiği belirlenmiştir (Sánchez-Estrada ve Cuevas, 2019). Manzanillo çeşidi ile ilgili başka bir çalışmada ise söz konusu çeşit kendine uyuşmaz olarak nitelendirilse (Cuevas ve Polito, 1997)’de, Wu ve ark. (2002), yaptıkları çalışmada kısmi uyuşmazlık özelliğini gösterdiğini bildirmişlerdir.

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri



Şekil 7. Saurani, Kilis yağlık ve Sarı Ulak çeşitlerinde çiçek tozu gelişimi ve oluşan anormalilikler. A-C ‘Saurani’ zeytin çeşidinde çiçek tozu çim borusu uzaması. A. Tozlanmanın 2. ve 6. saatlerinde çiçek tozu çim borularının stigma üzerinde çimlenerek stigmayı delmesi, Ölçek çubuğu: 100µ. B. Çiçek tozu çim borusunun 24. saatte stilde ilerlemesi, Ölçek çubuğu: 50µ. C. Çiçek tozu çim borusunun 36. saatte tohum taslağına ulaşması, Ölçek çubuğu: 100µ. D-F. ‘Kilis yağlık’ çeşidinde çim borusu gelişimi. D. 12. saatte çiçek tozu çim borularının stigma yüzeyinde çimlenmiş görüntüleri, Ölçek çubuğu: 50µ. E-F. 36. saat itibariyle çiçek tozu çim borularında gerçekleşen anormal gelişmeler. E, Çiçek tozu çim borularının stigma üzerinde kıvrılması, Ölçek çubuğu: 50µ. F. Çiçek tozu çim borusunun ucunun şişmesi, Ölçek çubuğu: 50µ. G-H ‘Sarı ulak’ çeşidinde çiçek tozu çim borularının stil içerisindeki anormal görüntüleri. H. Çiçek tozu çim borularının stilin yarısında kıvrılmaya başlaması ve kalloz oluşumunun artması, Ölçek çubuğu: 50µ.

Tozlama Yöntemlerinin Kullanılabilirliği

Yapılan iki tozlama çalışmasının histolojik sonuçları karşılaştırıldığında emaskülasyon sonrasında tozlama yönteminin çim borusu gelişiminin incelenmesi ve uyuşmazlık tayini için uygun olduğu buna karşın tozlama aşamasında zor uygulanan bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Ancak, canlılık düzeyi bilinen çiçek tozları ile bilinen saatte yapılan tozlama işlemleri ile etkin bir tozlanmanın sağlandığı görülmüştür.

Kese sallama yöntemi ile yapılan tozlama çalışmalardan elde edilen örnekler incelendiğinde ise çiçek tozlarının dişi organlara yeterli miktarda ulaşmadığında etkili bir tozlanma işleminin olmadığı görülmüştür. Elde edilen örneklerin bazılarında ilk aşamalarda stilde ilerleme görülürken ileriki aşamalarda daha yeni çimlenmeler ile karşılaşılmıştır. Bazı durumlarda da aynı aşama olarak alınmış bir örnekte çiçek tozu çim boruları stilde iken bazısında ya hiç çiçek tozu olmadığı ya da çiçek tozunun yeni çimlenmeye başlamış olabildiği

görülmüştür. Bu durum, stigma reseptifliği uzun olan zeytin çiçeğinde çiçeklerin hangi gün tozlandığının, tozlamada kullanılan çiçek tozlarının canlılığının ve çiçeklerin tozlama sırasında hangi aşamada olabileceğinin morfolojik olarak belirlenememesine neden olacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, yapılan incelemeler sonucunda farklı aşamalarda çiçeklerde de olsa saatlik örneklerdeki kritik görüntülere benzer görüntüler elde edilmiş ve belirli aşamalarda alınacak fazla sayıdaki çiçek örneklerinde yapılacak histolojik analizler sonucunda eşeyssel uyuşmazlık varlığının belirlenebileceği tespit edilmiştir.

Önceki çalışmalara kıyasla emaskülasyon sonrasında tozlama işlemleri daha önce Dölek-Gencer (2020)’de de belirtilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Seifi ve ark. (2011), tarafından kese sallama yöntemi ile benzer şekilde incelenerek uyuşmazlık durumunu belirlenebildiği bildirilmiştir. Bu durumda, saat belirlemesi gibi hassas bir çalışma

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri

yapılmayacaksa ve sadece durum belirlemesi yapılmak isteniyorsa tozlama işlemi ve örnekleme daha kolay olan kese sallama yöntemi kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak, çiçek tozunun hangi aşamada veya hangi saatte durduğu gibi bilgilere ihtiyaç varsa mutlaka emaskülasyon sonrasında bilinen saatte çiçek tozunun stigma üzerine taşınması gerekmektedir.

Sonuçlar

Zeytin bitkisindeki kendine uyumsuzluk sistemi, üretim ve yetiştirme açısından önemli sonuçları olan geniş kapsamlı bir araştırma konusu olmuştur. Zeytinde kendine uyumsuzluğun incelenmesi, etkili üretim strateji-lerinin geliştirilmesi ve zeytin yetiştirme uygulamalarının iyileştirilmesi açısından hayati öneme sahiptir. Zeytinde eşeyssel uyumsuzluk belirtilerinin tozlanmadan sonra hangi dönemde oluştuğunun görülmesini amaçlayan bu çalışmada kendine uyuşur 'Saurani', yarı uyuşur "Sarı ulak" ve kendine uyuşmaz özellik gösteren "Kilis yağlık" zeytin çeşitlerinde tozlama sonrasında çiçek tozu çim borusu büyümesi incelenmiştir. Ayrıca, yapılan iki farklı tozlama çalışması ile çiçek tozu çim borusu gelişimi incelemesini amaçlayan çalışmalarda farklı

Kaynaklar

- Arzani, K., & Javady, T. (2000, September). Study of Flower Biology and Pollen Tube Growth of Mature Olive Tree Cv.'Zard'. In IV International Symposium On Olive Growing 586 (Pp. 545-548).
- Ateyyeh, A. F., Stosser, R., & Qrunfleh, M. (2000). Reproductive Biology of The Olive (*Olea Europaea L.*) Cultivar 'Nabali Baladi'. *J. Appl. Bot*, 74, 255-270.
- Bartolini, S.; Guerrero, R. (1995) Self-compatibility in several clones of oil olive cv. Leccino. *Advances in Horticultural Science*, 71-74.
- Cuevas, J., Rallo, L., & Rapoport, H. F. (1993, September). Staining Procedure For The Observation of Olive Pollen Tube Behaviour. In II International Symposium on Olive Growing 356 (Pp. 264-267).

yöntemlerin kullanılabilirliği belirlenmiştir. Bununla birlikte inceleme esnasında zeytin çiçeğinde dişi organın ve çiçek tozu çim borusu gelişiminin detaylı yapısı da incelenmiştir. Çalışma sonucunda çeşitlerin eşeyssel uyuma düzeyleri doğrulanmış olup, çiçek tozu çim borularının 'Saurani' çeşidinde 2. günde tohum taslaklarına ulaşırken, 'Kilis yağlık' çeşidinde çiçek tozu çim borularının 36. saatte stigmada, 'Sarı ulak' çeşidinde ise 60. saatte stil içerisinde durdurulduğu tespit edilmiştir. Yapılan farklı tozlama uygulamalarının kullanılabilirliği konusunda ise uyumsuzluğun başlangıç zamanının belirlenmesi açısından yapılacak hassas çalışmalarda emaskülasyon sonrasında tozlama işleminin kullanılmasının şart olduğu, sadece durum belirlemesi üzerine yapılacak çalışmalarda kese sallama yönteminin yeterli olacağı kanısına varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) (Proje no:5188) tarafından desteklenmiştir. Yazarlar arazi çalışmalarında katkılarından dolayı Zir. Yük. Müh. Gönül UTKANER, Dr. Özgür DURSUN, Zir. Müh. Umut GÜL'e teşekkür eder.

- Cuevas, J., & Polito, V. S. (1997). Compatibility relationships in Manzanillo'olive. *HortScience*, 32(6), 1056-1058.
- Franklin-Tong, V. E. (2008). Self-incompatibility in flowering plants. *Evolution, diversity, and mechanisms*, 305.
- East, E. M. (1934) The Reaction of The Stigmatic Tissue Against Pollen-Tube Growth In Selfed Self-Sterile Plants. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 20.6: 364-368.
- Fraga H., Moriondo M., Leolini L. and Santos J. A. (2021). Mediterranean Olive Orchards Under Climate Change: A Review of Future Impacts And Adaptation Strategies, *Agronomy*, 11, 56. <https://doi.org/10.3390/Agronomy11010056>.
- Gencer, C. (2020). Gemlik, Sarı Ulak ve Domat Zeytin Çeşitlerinin Döllenme Biyolojileri Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi.

Zeytinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumunun Belirlenmesi ve Uyuşmazlık Araştırmalarında Kullanılabilecek Tozlama Yöntemleri

- Gencer, C. D., Özkaya, M. T., Eti, S., & Karabıyık, Ş. (2023). Evaluation of the effect of open-, self-and cross pollinations on fruit set in Domat, Gemlik and Sarı Ulak olive cultivars. *Scientia Horticulturae*, 311, 111780.
- Kaya, H., Sefer, F., Mete, N., Çetin, Ö., Hakan, M., Şahin, M., ... Savran, K. (2015). Türkiye zeytin çeşit kataloğu. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, İzmir.
- Lavee, S. (1996). Biology and physiology of the olive. *Olive Encyclopaedia*, International Olive Oil Council, Principe de Vergara, 154, 28002.
- Mete, N. & Çetin, Ö. (2017). Kilis Yağlık Zeytin Çeşidinde Döllenme Sorununun Araştırılması. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(4), 376-384.
- Rea, A. C., & Nasrallah, J. B. (2004). Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plant. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 627-636.
- Reale, L., Sgromo, C., Bonofiglio, T., Orlandi, F., Fornaciari, M., Ferranti, F., & Romano, B. (2006). Reproductive biology of olive (*Olea europaea L.*) DOP Umbria cultivars. *Sexual Plant Reproduction*, 19, 151-161.
- Sánchez-Estrada, A., & Cuevas, J. (2019). Pollen-Pistil İnteraction in 'Manzanillo' olive (*Olea europaea L.*) Under Self-, Free-And Cross-Pollination. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 25(3), 141-150.
- Seifi, E., Guerin, J., Kaiser, B., & Sedgley, M. (2011). Sexual Compatibility and Floral Biology of Some Olive Cultivars. *New Zealand Journal of Crop And Horticultural Science*, 39(2), 141-151.
- Serrano, I., Suárez, C., Olmedilla, A., Rapoport, H. F., & Rodríguez-García, M. I. (2008). Structural organization and cytochemical features of the pistil in olive (*Olea europaea L.*) cv. Picual at anthesis. *Sexual Plant Reproduction*, 21, 99-111.
- Karabıyık, Ş. (2022). Effects of temperature on pollen viability and in vivo pollen tube growth in *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Botany & Food Quality*, 95.
- Vuletin Selak, G., Cuevas, J., Pinillos, V., Goreta Ban, S., Poljak, M., & Perica, S. (2014). Assessment of Effective Pollination Period İn Olive (*Olea europaea*) By Means of Fluorescence Microscopy and Plant Response To Sequential Pollinations: Limitations And Drawbacks Of Current Methodologies. *Trees*, 28, 1497-1505.
- Quero A., Pinillos V. and Cuevas J.(2002). Reduced Ovule Longevity Increases Cross-Pollination Response in Olive, Article in *Acta Horticulturae*. October 2002.
- Wu, S. B., Collins, G., & Sedgley, M. (2002). Sexual Compatibility within and between Olive Cultivars. *The Journal Of Horticultural Science And Biotechnology*, 77(6), 665-673.



Research Article

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

Elif Şeyma BAĞDAT¹, Özge KAHRAMAN ILIKKAN^{*2}

ABSTRACT

The effect of propolis fortification on kefir microbiota and kefir properties was investigated. Kefir samples were fortified with 0.5% (20 mg) (P1) or 1% (40 mg) propolis (P2) to improve the nutritional value of kefir. Similar studies on dairy products were evaluated to determine these ratios. After the first day and 7th day of storage, microbial enumerations, and physicochemical properties were determined. Total phenolic content and antioxidant capacity were analyzed with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity assay after the 7th day of storage. 0.5% propolis fortification slightly changed the physicochemical properties of kefir within acceptable ranges compared to the control. Propolis exhibited a prebiotic effect on lactococci after the 7th day of storage. Sensory analysis revealed 0.5% propolis-fortified kefir was more acceptable. Total phenolic content as well as radical scavenging activity increased compared to the control. The results show that propolis can be used to improve the nutritional value of kefir products and develop an innovative functional product, but 0.5% fortification is more acceptable in terms of sensory properties.

Keywords: Propolis, kefir, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), total phenolic

Propolisle Zenginleştirilmiş Kefir İçeceğinin Mikrobiyolojik, Fizikokimyasal ve Duyusal Özelliklerinin Araştırılması

ÖZ

Propolis takviyesinin kefir mikrobiyotası ve kefir özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kefir örnekleri, kefirin besin değerini artırmak için %0.5 (20 mg) (P1) veya %1 (40 mg) propolis (P2) ile zenginleştirilmiştir. Bu oranlar seçilirken literatürde süt ürünleriyle yapılan benzer çalışmalardan yararlanılmıştır. Depolamanın ilk günü ve 7. gününden sonra, mikrobiyal sayımlar ve fizikokimyasal özellikler belirlenmiştir. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite, depolamanın 7. gününden sonra 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme aktivitesi testi ile analiz edilmiştir. %0.5 propolis takviyesi, kefirin fizikokimyasal özelliklerini kontrole kıyasla kabul edilebilir aralıklarda hafifçe değiştirmiştir. Propolis, depolamanın 7. gününden sonra laktokoklar üzerinde prebiyotik bir etki göstermiştir. Duyusal analiz, %0,5 propolisle güçlendirilmiş kefirin daha kabul edilebilir olduğunu ortaya koymuştur. Toplam fenolik içeriğin yanı sıra radikal süpürme aktivitesi de kontrole kıyasla artmıştır. Sonuçlar, propolisin kefir ürünlerinin besin değerlerini iyileştirmek ve yenilikçi fonksiyonel bir ürün geliştirmek için kullanılabileceğini, ancak %0,5'lik zenginleştirmenin duyusal özellikler bakımından daha kabul edilebilir olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Propolis, kefir, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), toplam fenolik

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-6627-7270, 0000-0001-5843-6868

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 12.08.2023

Kabul Tarihi: 03.01.2024

² Başkent University, Kahramankazan Vocational School, Food Technology Program, 06980, Ankara

² Başkent University, Kahramankazan Vocational School, Food Quality Control and Analysis Program, 06980, Ankara

*E-posta: okilikkan@baskent.edu.tr

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

Introduction

Propolis is a substance protecting hive and is also known as “bee glue”. It is collected from plants by bees as a resinous material and is transferred to a hive to form its propolis employing enzymes (Bhargava vd., 2021; Özkök vd., 2021). The most important role of propolis is to protect the hive from microorganisms and predators (Bhargava vd., 2021). Propolis can contain phenolic compounds, flavonoids, and terpenes (Irigoitı vd., 2021). Propolis has been used since ancient times and has been known to have medicinal properties such as antibacterial, antioxidant, prebiotics, anticancer, hepatoprotective, antiviral, and anti-inflammatory (Ali ve Kunugi, 2021; Bhargava vd., 2021; Özkök vd., 2021). The potential therapeutic effect of propolis has been studied and has been shown that it can modulate metabolic syndrome as well as anti-cancer effects. Additionally, propolis has been shown to have the potential to inhibit viral spike fusion in host cells by molecular simulations (Ali ve Kunugi, 2021). COVID-19 patients exhibited earlier viral clearance by consuming propolis (Ali ve Kunugi, 2021; Berretta vd., 2020). It increases the production of short-chain fatty acids (SCFA) and modulates the gut microbiota (Xue vd., 2019). Therefore, propolis has been used as a functional food ingredient or sole formulation (Irigoitı vd., 2021).

Kefir is a traditional beverage fermented by starter cultures called “kefir grains” (Ilıkkan ve Bağdat, 2021). The Caucasus, Tibetan, and Mongolian mountains are the origin of Kefir (Kazou vd., 2021). Türkiye, Argentina, Russia, Taiwan, and Brazil are the countries that consume Kefir and it has been very popular because of its refreshing effect (de Lima vd., 2018). Kefir has a symbiotic microflora consisting of yeast and lactic acid bacteria. Kefir promotes human health because its microflora has dominantly

lactic acid bacteria (Bengoa vd., 2019). Kefir and its polysaccharide substance “Kefiran” have many benefits such as being antimicrobial and antiproliferative (Verce vd., 2019).

This study is the first report comprehensively investigating the effect of kefir enriched with propolis on antioxidant capacity, kefir microbiota, total phenolic, sensory, and physicochemical properties. The fortification aimed to improve the beneficial properties of kefir and to investigate the prebiotic effect of propolis.

Material and Methods

Propolis

Food grade anatolian propolis was used in this study that is brown, water extract, and manufactured in Turkey. The propolis was purchased from an approved market (Bee’O, Sbs Bilimsel Bio Çözümler San. Tic. A.Ş., Turkey, 20 ml). Total phenolic content, total flavonoid content, phenolic compounds, and antioxidant capacity were provided by the company

(<https://www.beeo.com.tr/analizlerimiz#fan-cybox-grup-2>). The pH of propolis is 5.3 ± 0.02 and the total dry matter is 11.30 ± 1.5

(<https://www.beeo.com.tr/analizlerimiz#fan-cybox-grup-4>). Small amounts of propolis are desired as it has a strong flavor. Concentrations of propolis have been selected according to previous studies investigating only the organoleptic character of kefir fortified with propolis (Chon vd., 2020). In this mentioned study, 0.5% of propolis exhibited a better flavor results than control group and 1% was close to the control (Chon vd., 2020). Therefore, in this present study, 0.5% corresponding to 20 mg of propolis, and 1% corresponding to 40 mg of propolis concentration have been selected.

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

Preparation of Kefir samples

Kefir grains used in this study were previously characterized with metataxonomic analysis (Ilıkkın ve Bağdat, 2021). 100 ml of pasteurized cow milk, which contains 3.5% milkfat, were inoculated with 3 g of kefir grains. The sample containing no propolis was prepared as control kefir (C), one of the kefirs was fortified with 0.5% propolis (10 drops, % 0.5) (P1) and the other with 1% propolis (20 drops, % 1) (P2). These ratios were selected according to a previous study that analyze the organoleptic character of kefirs fortified with propolis (Chon vd., 2020). Fermented kefir was kept at 4°C until the 7th day of storage after the removal of kefir grains.

Yeast/mold, Lactobacilli and lactococci content of kefirs

Lactobacilli was detected by counting on MRS agar (Merck, Darmstadt, Germany) and agar plates were incubated for 48 h at 37°C in anaerobic jars (Anaerocult System: Merck 16275, Merck KGaA). M17 was used to count lactococci (Merck, Darmstadt, Germany) and plates were incubated for 48 h at 37°C aerobically. Dichloran Rose Bengal Chloram Phenicol Agar (Merck, Darmstadt, Germany) was used for yeast/molds and plates were incubated for 7 days at 25°C.

Physicochemical analysis

AOAC International Method (AOAC, 2016) was used for total dry matter by the gravimetric method. A digital pH meter (Inolab wtw 720) was used to measure the pH. 10 ml of kefir was used to determine titratable acidity by titrating with 0.1 N NaOH (Sulmiyati vd., 2019). Brix meter was used to detect to Brix value (HI96801, Hanna Instruments, USA).

Total phenolic content (TPC)

The total phenolic content (TPC) was determined by using Folin–Ciocalteu reagent. 80% methanol (Merck, Darmstadt, Germany) was added to kefir sample and solution at room temperature for 4 h. Supernatants were filtered with syringe filter (0.45µm, PTFE/L) after the extracts were centrifuged at 1470 × g for 5 min. 2.5 ml of Folin-Ciocalteu reagent was mixed with the filtrate (Merck, Darmstadt, Germany) and 2 ml of Na₂CO₃ (7.5 %) solution (Merck, Darmstadt, Germany). Samples were kept for 30 min at room temperature and dark. 760 nm wavelength was used to measure absorbances and mg gallic acid equivalent/kg was used to express results of kefir samples (Ozkan vd., 2018; Sözeri Atik vd., 2021).

Antioxidant capacity

The antioxidant properties of kefir were determined with DPPH radical scavenging activity. 4.9 ml of DPPH solution (in methanol, 99%) (Merck, Darmstadt, Germany) was mixed with 100 µl of the supernatant taken from total phenolic content analysis. The mixtures were kept for 30 min at room temperature and dark. 517 nm wavelength was used to measure absorbances of samples. The % inhibition was calculated as follows, Absorbance of blank – Absorbance of the sample / Absorbance of blank x 100 (Salar vd., 2015).

Organoleptic testing

Sensory analyses of kefir samples were carried out on the 1st day of the kefir production. Evaluation of the samples was made according to the following criteria; appearance, texture, odor, flavor, consistency, and overall acceptability. Parameters were evaluated by a panel of 13 members who are semi-educated and familiar with kefir (Nadir Işık, 1979). Panelists scored the samples on a hedonic

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

scale from 1 to 5 indicating “poor” to “excellent”, respectively (Chon vd., 2020; Pehlivan vd., 2023). The ethical approval number was taken (E-89595671-042-223340).

Statistical Analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey Kramer honestly significant difference (HSD) was applied to samples to determine differences in the treatments based on three replicates using the JMP Pro 14. $P < 0.05$ was selected to determine the significance of differences.

Results and Discussion

Kefir grains

The microbiota of kefir grains used in this study was characterized by the metataxonomic approach in the previous study (Ilikkan ve Bağdat, 2021). Therefore, kefir grains have been known to have dominantly, namely, 65% *Bifidobacterium longum*.

Physicochemical analysis of Kefirs

To assess and compare the quality of kefir after fortification, the physico-chemical properties of kefir were analysed (Table 1). Results were in the acceptable range for kefir quality at day 0. pH values of control, P1, and P2 were 3.74, 3.91, and 3.97, respectively. Even though the pH values of fortified samples were higher than the control, they were within the acceptable range for kefir quality. The higher pH value of P1 and P2 were probably due to the content of propolis. Accordingly, the titratable acidity (% lactic acid) of control was 1.1%, P1 was 1.0%, and P2 was 0.9. The total dry matter of kefir fortified with propolis was higher than the control as expected because of the propolis. Accordingly, Brix values, which indicate non-fat dry matter, were 5.7, 7.1, and 7.8 for control, P1, and P2, respectively. P1 and P2

were higher than the control due to the content of propolis.

On day 7 of storage, pH values were slightly but statistically higher than values of day 0. However, the titratable acidity of samples, namely, lactic acid, was statically the same during the storage except for control which increased slightly. Brix values were statistically the same for control and P1 except for P2 which decreased. Accordingly, also, the total dry matter of P2 decreased after the 7th day of storage.

Microbial enumeration of fermented milk kefirs

On the first day of storage, only yeast and molds were slightly affected by propolis addition, and the number of yeasts decreased compared to the control. However, counts of lactobacilli and lactococci did not statistically change. Decreasing yeast did not affect the physicochemical properties of kefir. Fortification did not affect lactobacilli and lactococci at day 0.

On day 7, even though the number of lactobacilli in P1 and P2 slightly decrease compared to the control, there was no significant difference between the storage times of samples. The number of lactococci decreased on day 7 compared to day 0 but the control decreased more than P1 and P2. Yeast/mold numbers of P1 and P2 were lower than control on day 7 as at day 0, however, on day 7, yeast/mold numbers slightly increased, especially, for P1 compared to day 0 (Table 2). The preservation of lactic acid bacteria during storage may also indicate that the sensory properties of kefir are partially preserved. The product's stability is improved with the addition of propolis. At the same time, the fact that yeast and mold formation was less in both samples compared to the control was an indication that the product was better protected against undesirable microorganisms during storage.

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

Table 1: Physicochemical properties of kefir fortified with propolis at day 0 and 7

Storage Time	Sample	pH	Titrateable Acidity	Brix	Total Dry Matter
0	C	3.74±0.01 ^{Cb}	1.10±0.01 ^{Ab}	5.70±0.00 ^{Ca}	9.70±0.00 ^{Ca}
	P1	3.91±0.01 ^{Bb}	1.05±0.01 ^{Ba}	7.10±0.10 ^{Bb}	11.70±0.00 ^{Aa}
	P2	3.97±0.01 ^{Ab}	0.92±0.02 ^{Ca}	7.75±0.15 ^{Aa}	11.30±0.00 ^{Ba}
7	C	3.79±0.01 ^{Ca}	1.15±0.05 ^{Aa}	5.70±0.00 ^{Ca}	9.25±0.05 ^{Bb}
	P1	4.05±0.00 ^{Ba}	1.05±0.01 ^{Aa}	7.45±0.05 ^{Aa}	11.65±0.05 ^{Ba}
	P2	4.12±0.00 ^{Aa}	0.89±0.01 ^{Ba}	6.95±0.05 ^{Bb}	9.65±0.05 ^{Bb}

^{Ab}Values with different superscript letters are significantly different (ANOVA, * $p < 0.05$) according to the Tukey HSD test ($n = 3$). Upper-case letters present the differences between the samples in the same storage time and lower-case letters show differences between the storage times of samples (i.e., Control 1st day and Control 7th day).

Table 2: Effect of kefir fortified with propolis on kefir microbiota (\log_{10} cfu/g)

Storage Time	Sample	Lactobacilli	Lactococci	Yeast/Mold
0	C	7.1±0.0 ^{Aa}	8.6±0.2 ^{Aa}	6.9±0.2 ^{Aa}
	P1	6.8±0.1 ^{Aa}	8.9±0.0 ^{Aa}	6.5±0.3 ^{Bb}
	P2	7.1±0.3 ^{Aa}	8.8±0.4 ^{Aa}	6.4±0.1 ^{Ba}
7	C	7.3±0.0 ^{Aa}	7.2±0.1 ^{Bb}	7.1±0.0 ^{Aa}
	P1	7.0±0.1 ^{Ba}	7.6±0.2 ^{Ab}	6.7±0.1 ^{Ba}
	P2	7.0±0.0 ^{Ba}	7.8±0.3 ^{Ab}	6.5±0.1 ^{Ca}

^{Ab}Values with different superscript letters are significantly different (ANOVA, * $p < 0.05$) according to the Tukey HSD test ($n = 3$). Upper-case letters present the differences between the samples in the same storage time and lower-case letters show differences between the storage times of samples (i.e., Control 1st day and Control 7th day).

Propolis has been evaluated as a food additive in yogurt in a previous study, as compatible with our research, lactobacilli in yogurt were inhibited by 0.03% propolis addition, however, streptococci increased (Güneş-Bayır vd., 2020).

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

Total phenolic content and antioxidant capacity

Kefir has been known to have an antioxidant capacity (Yilmaz-Ersan vd., 2018). In addition to this, propolis has also known to have high phenolic content (Özkök vd., 2021). The total phenolic concentration of the control was 46.40 ± 0.08 , and P1 and P2 had statistically higher total phenolic content than the control, 60.08 ± 0.08 and 67.28 ± 0.08 , respectively (Figure 1). Accordingly, DPPH scavenging assay results indicated that P1 and P2 had statistically higher scavenging effects compared to the control. Control kefir had 3.1 ± 0.08 %, P1 had 6.1 ± 0.08 %, and P2 had 11.0 ± 0.12 % (Figure 2). In previous studies conducted with kefir produced by goat and soy milk, antioxidant activity was stated to be 5.52 ± 0.99 % and 8.08 ± 1.23 , respectively (Nurliyani ve Sunarti, 2015).

Propolis is a health-promoting bee product. Recently, it has a great attraction for food additives because of its properties such as antiviral, antibacterial, cariostatic, antioxidant, hepatoprotective, and anticancer (Özer, 2020). Therefore, in this present study, it was evaluated the potential to fortify kefir samples with propolis. According to the physicochemical properties of kefir fortified with a different range of propolis, pH values of control were compatible with previous studies. In previous studies conducted with kefir, pH values were in the range between around 3.7-4.0 (Chon vd., 2020; Gürsoy vd., 2020; Ilıkkın ve Bağdat, 2021). Titratable acidity values were consistent with previous studies which detect titratable acidity between 0.71 and 1.1% (Gürsoy vd., 2020; Ilıkkın ve Bağdat, 2021; Yirmibeşoğlu ve Tefon Öztürk, 2020). In another study, Brix values were found to be between 5 and 7 as found in this study (Hong vd., 2019). After the 7th day of storage, it was observed that the total

dry matter of P2 decreased, this can be due to the microbial fermentation process.

Only pH values of kefir fortified with propolis were evaluated in a preliminary study previously, but, with market kefir and on the first day of storage. Compared to this study, the pH value of the control was the same in this research, which is 3.74. However, the pH values of kefir fortified with propolis were higher than in this mentioned study. The higher pH values were more likely because of the inhibition of lactobacilli, the decreasing of percentage of lactic acid (TA%) confirmed this (Chon vd., 2020). Microbial enumerations showed that propolis exhibited a prebiotic effect for lactococci after the 7th day of storage. Total phenolic and DPPH were higher in propolis samples. Propolis increased its scavenging effect in both kefir samples (P1 and P2) as expected.

Sensory properties

Five properties were selected for sensory evaluation, namely, appearance, texture, odor, flavor, consistency, and overall acceptability (Figure 3). 5-point scales were used by the panelists. The appearance score of control was 4.54 ± 0.78 while P1 and P2 were 4.31 ± 0.85 and 4.15 ± 0.80 , respectively. The consistency score of control was 4.31 ± 0.80 while P1 and P2 were 3.92 ± 1.19 and 3.85 ± 1.18 , respectively. The texture score of the control was 4.54 ± 0.78 while P1 and P2 were 4.15 ± 1.07 and 3.77 ± 1.42 , respectively. The odor score of the control was 3.69 ± 1.11 while P1 and P2 were 3.31 ± 1.11 and 2.62 ± 1.45 , respectively. The flavor score of the control was 4.23 ± 0.73 while P1 and P2 were 3.69 ± 1.25 and 2.62 ± 1.45 , respectively. The overall preferences score of control was 4.38 ± 0.77 while P1 and P2 were 3.62 ± 1.33 and 2.85 ± 1.21 , respectively.

According to statistical analysis of the sensory analysis of Kefir, there was a

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

statistically significant difference in only taste and overall acceptability between the 1% propolis-fortified group and the control group ($p < 0.05$). Propolis addition did not change other properties of kefir according to panelists. In a study conducted with organoleptic testing of kefir, there was a statistically significant difference in taste,

flavor, color, texture, and overall acceptability in 1% propolis-fortified kefir (Chon *et al.*, 2020). However, kefir fortified with 0.5% of propolis showed the best results compared with the control being like this study. Taste and general acceptability are also very important parameters for consumer perception.

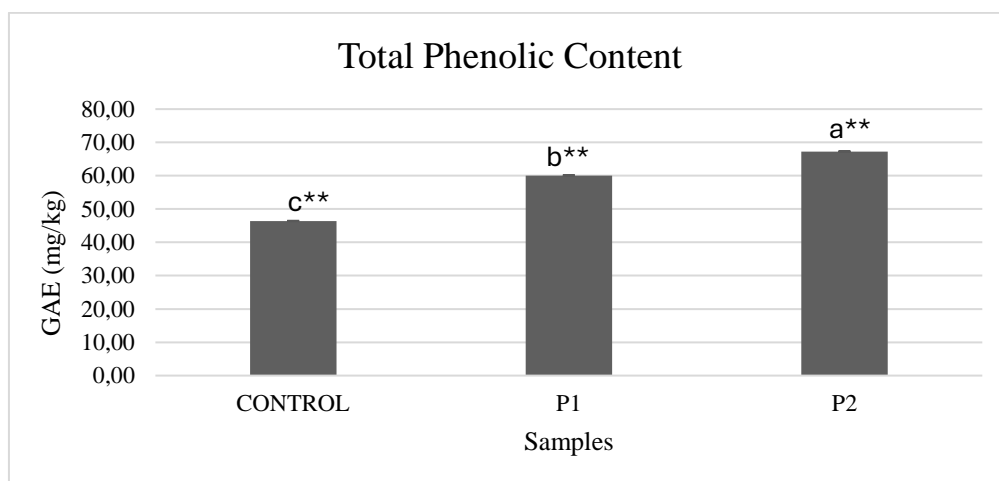


Figure 1: Total phenolic contents of kefir fortified with propolis after 7th day of fermentation. Different superscript letters significantly indicate difference (ANOVA, ** $p < 0.01$) according to the Tukey HSD test ($n = 3$).

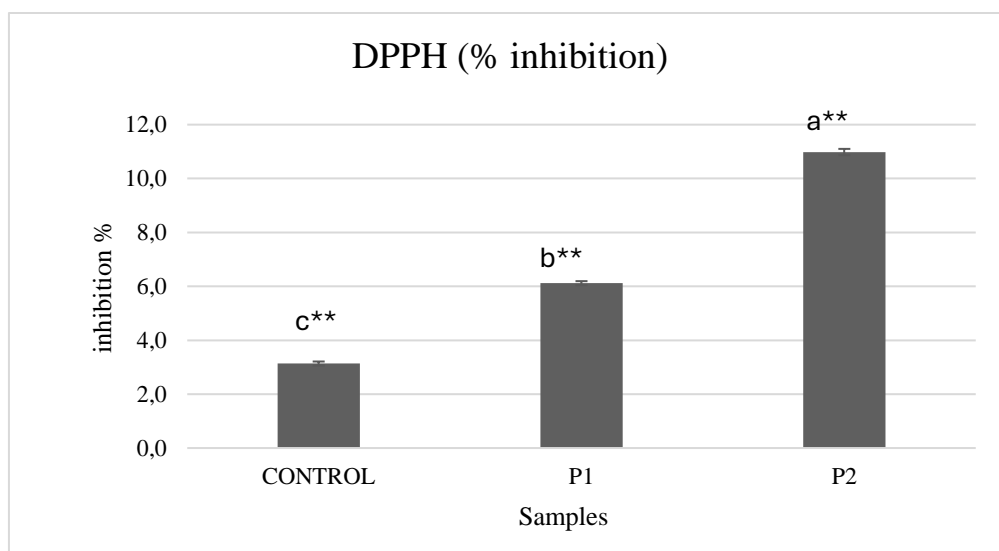


Figure 2: % inhibition with DPPH radical scavenging assay of kefir fortified with propolis. Different superscript letters indicate significantly difference (ANOVA, ** $p < 0.01$) according to the Tukey HSD test ($n = 3$). DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

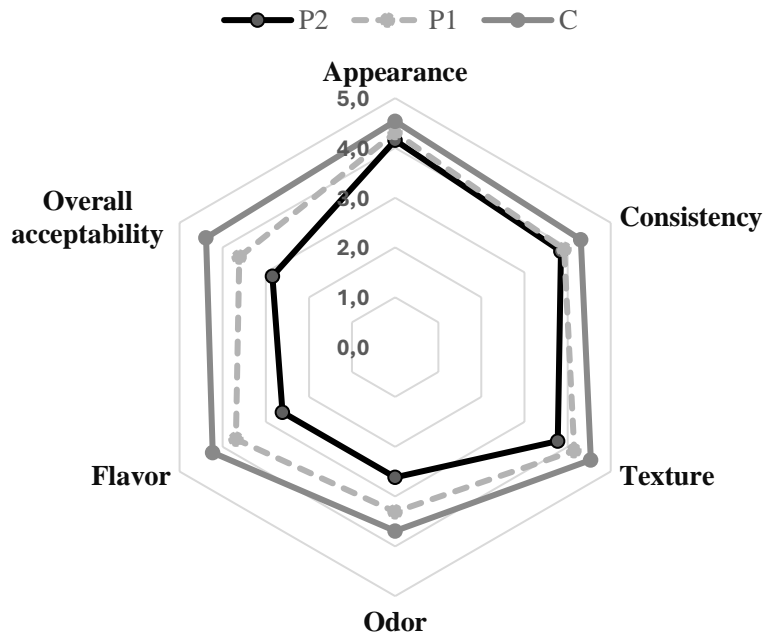


Figure 3: Sensory evaluation of kefir samples on the 1st day of production. P1: 0.5% fortified kefir, P2: 1% fortified kefir, C: Control

Kefir consumers may not be comfortable with a taste that is not like the normal, so the P1 sample, which is closer to control and has a higher level of general acceptability, was selected.

Consequently, the sensory results of two studies confirmed 0.5% propolis can be used in kefir fortification.

The present study is the first report comprehensively investigating the effect of kefir fortified with propolis on the physicochemical, microbiological, antioxidant activity, and total phenolic properties. Different studies previously conducted with different dairy products also support the results. In a study conducted with ice cream, it was recommended to add 0.6% of propolis by evaluating various ratios. Organoleptic and physicochemical parameters were not affected by these dosages, but they also allowed the enrichment of the product with biologically valuable components (Mironova *vd.*, 2020). In another study, when antioxidant activity analyzes and sensory analyzes were

evaluated together, the ideal groups for the production of propolis-added milk products are groups containing 0.2% and 0.3% propolis, such as ice cream (Mehmetoğlu ve Tarakçı, 2023). The study showed that %0,5 propolis fortification did not extremely change the physicochemical properties as well as the microbial composition of kefir. In addition, propolis exhibited a prebiotic effect on lactococci. Even though there is no recommended daily allowance of propolis provided by food authorities, this amount was advised by the manufacturer for daily intake. The evidence from this study suggests that 0.5% propolis can be used to enhance the nutritional values of kefir.

Conclusion

Propolis, a substance protecting hives and is also known as “bee glue”, has many health promoting effect. Therefore, the consumption of Propolis has been recommended due to the content of several phenolic compounds, flavonoids, and terpenes. In this research, two healthy foods

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

have been combined to increase health benefits of kefir. Consequently, production of kefir with propolis will provide consumers extra benefits.

References

- Ali, A. M., Kunugi, H. 2021. "Propolis, bee honey, and their components protect against coronavirus disease 2019 (Covid-19): A review of in silico, in vitro, and clinical studies". *Molecules*, 26(5). AOAC. 2016. "AOAC". Official Methods of Analysis. 17th ed. AOAC International, Washington, DC.
- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., Abraham, A. G. 2019. "Kefir microorganisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk". *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686–700.
- Berretta, A. A., Silveira, M. A. D., Córdor Capcha, J. M., De Jong, D. 2020. "Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease: Running title: Propolis against SARS-CoV-2 infection and COVID-19". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 131(June).
- Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R., Kaul, S. C. 2021. "Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis". *Nutrients*, 13(8).
- Chon, J.-W., Seo, K.-H., Oh, H., Jeong, D., Song, K.-Y. 2020. "Chemical and Organoleptic Properties of Some Dairy Products Supplemented with Various Concentration of Propolis: A Preliminary Study". *Journal of Dairy Science and Biotechnology*, 38(2), 59–69.
- de Lima, M. dos S. F., da Silva, R. A., da Silva, M. F., da Silva, P. A. B., Costa, R. M. P. B., Teixeira, J. A. C., ... Cavalcanti, M. T. H. 2018. "Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides". *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 446–455.
- Güneş-Bayır, A., Bilgin, M. G., Kutlu, S. S., Demirci, D., Gölgeci, F. N. 2020. "Microbiological, chemical and sensory analyzes of produced probiotic yoghurts added clove and propolis". *Icontech International Journal*, 4(2), 1–14.
- Gürsoy, O., Kocatürk, K., Güler Dal, H. Ö., Yakalı, H. N., Yılmaz, Y. 2020. "Physicochemical and Rheological Properties of Commercial Kefir Drinks". *Akademik Gıda*, 18(4), 375–381.
- Hong, J. Y., Lee, N. K., Yi, S. H., Hong, S. P., Paik, H. D. 2019. "Short communication: Physicochemical features and microbial community of milk kefir using a potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* KU200284". *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10845–10849.
- Ilıkkın, Ö. K., Bağdat, E. Ş. 2021. "Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis". *Lwt*, 152(July).
- Irigoiti, Y., Navarro, A., Yamul, D., Libonatti, C., Tabera, A., Basualdo, M. 2021. "The use of propolis as a functional food ingredient: A review". *Trends in Food Science and Technology*, 115(June), 297–306.
- Kazou, M., Grafakou, A., Tsakalidou, E., Georgalaki, M. 2021. "Zooming Into the Microbiota of Home-Made and Industrial Kefir Produced in Greece Using Classical Microbiological and Amplicon-Based Metagenomics Analyses". *Frontiers in Microbiology*, 12(January), 1–17.
- Mehmetoğlu, S., Tarakçı, Z. 2023.

Investigation of Microbiological, Physicochemical, and Sensory Properties of a Kefir Drink Fortified with Propolis

- "Investigation of The Physicochemical Properties of Propolis Added Ice Creams During Storage". *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 20(2), 361–373.
- Mironova, I. V., Galieva, Z. A., Konovalov, S., Bychkova, T. S., Baydan, D. V., Rozhkov, K. A. 2020. "Enrichment of milk ice cream with bee products". *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 613(1).
- Nadir Işık. 1979. "Gıdaların Duyusal Analizlerinde Temel İlkeler". *Gıda*, 4(3).
- Nurliyani, H. E., Sunarti. 2015. "Antidiabetic Potential of Kefir Combination from Goat Milk and Soy Milk in Rats Induced with Streptozotocin-Nicotinamide". *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 847–858.
- Özer, E. D. 2020. "Propolis and Potential Use in Food Products". *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(5), 1139–1144.
- Ozkan, K., Sagcan, N., Ozulku, G., Sagdic, O., Toker, O. S., Muz, M. N. 2018. "Bioactive and bioaccessibility characteristics of honeybee pollens collected from different regions of Turkey". *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(1), 581–587.
- Özkök, A., Keskin, M., Tanuğur Samancı, A. E., Yorulmaz Önder, E., Takma, Ç. 2021. "Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis". *Applied Biological Chemistry*, 64(1).
- Pehlivan, A. D., Yadel, İ., Kılıç, N., Öztürk, H. İ. 2023. "The incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Chondrus crispus* algae in the production of functional ayran drinks: effects on physicochemical, microbiological, and sensory characteristics". *Journal of Food Measurement and Characterization*, (0123456789).
- Salar, R. K., Sharma, P., Purewal, S. S. 2015. "In vitro antioxidant and free radical scavenging activities of stem extract of *Euphorbia trigona* Miller". *Tang [Humanitas Medicine]*, 5(2), 14.1-14.6.
- Sözeri Atik, D., Gürbüz, B., Bölük, E., Palabıyık, İ. 2021. "Development of vegan kefir fortified with *Spirulina platensis*". *Food Bioscience*, 42(February), 40–46.
- Sulmiyati, Said, N. S., Fahrodi, D. U., Malaka, R., Maruddin, F. 2019. "The physicochemical, microbiology, and sensory characteristics of Kefir Goat Milk with different levels of Kefir Grain". *Tropical Animal Science Journal*, 42(2), 152–158.
- Verce, M., De Vuyst, L., Weckx, S. 2019. "Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species". *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 1–16.
- Xue, M., Liu, Y., Xu, H., Zhou, Z., Ma, Y., Sun, T., ... Liang, H. 2019. "Propolis modulates the gut microbiota and improves the intestinal mucosal barrier function in diabetic rats". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 118(August), 109393.
- Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpinar-Bayizit, A., Sahin, S. 2018. "Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefirs". *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3788–3798.
- Yirmibeşoğlu, S. S. S., Tefon Öztürk, B. E. 2020. "Comparing microbiological profiles, bioactivities, and physicochemical and sensory properties of donkey milk kefir and cow milk kefir". *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 44, 774–781.



Review Article

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

Ayşe SEVGİLİ^{1*}, Osman ERKMEN²

ABSTRACT

Sourdough microbiota determines bread properties such as leavening, aroma, and acid generation. Sourdough bread may also have an important place in nutrition and human microbiota. It is predicted that the difference in nutrition of people in different regions may have an impact on the microbiota. In this study, the sourdough microbiota was mapped by investigating the sourdough microbiota in Türkiye. *Saccharomyces*, *Candida*, *Torula*, and *Pichia* are the most targeted yeast genera with *Saccharomyces cerevisiae* being the most isolated in the study. The literature shows the highest species were isolated from the Central Anatolia Region. The most commonly isolated yeast is *Saccharomyces cerevisiae* within all regions. *Torula delbrueckii* and *Pichia guilliermondii* are the most isolated yeasts after *Saccharomyces cerevisiae*. The purpose of this study is to support the future study of topics such as microbiota-based nutritional diet, the relationship of human microbiota with health, and the effects of regionally dominant microbiota on our lives.

Keywords: Sourdough, yeast, microbiota, fermentation, map

Maya Mikrobiyotası ve Türkiye'den Ekşi Maya Haritası: Derleme

ÖZ

Ekşi maya mikrobiyotası ekmeğin mayalanma, aroma ve asit oluşumu gibi özelliklerini belirler. Ekşi mayalı ekmeğin beslenme ve insan mikrobiyotasında da önemli bir yeri olabilir. Farklı bölgelerdeki insanların beslenme farklılıklarının mikrobiyota üzerinde etkili olabileceği öngörülmektedir. Bu çalışmada, Türkiye'deki ekşi maya mikrobiyotası incelenerek ekşi maya mikrobiyotasının haritalaması yapılmıştır. *Saccharomyces*, *Candida*, *Torula* ve *Pichia*, araştırmada en fazla izole edilen *Saccharomyces cerevisiae* ile en çok hedeflenen maya cinsleridir. Literatürde en yüksek türün İç Anadolu Bölgesi'nden izole edildiği görülmektedir. Tüm bölgelerde en sık izole edilen maya *Saccharomyces cerevisiae*'dir. *Torula delbrueckii* ve *Pichia guilliermondii* ise *Saccharomyces cerevisiae*'den sonra en çok izole edilen mayalardır. Bu çalışmanın mikrobiyota temelli beslenme diyeti, insan mikrobiyotasının sağlıkla ilişkisi ve bölgesel olarak baskın mikrobiyotanın hayatımıza etkileri gibi konuların gelecekte yapılacak çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: Ekşi hamur, maya, mikrobiyota, fermentasyon, harita

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-9579-5074, 0000-0001-9113-9638

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 25.12.2023

Kabul Tarihi: 26.02.2024

¹Vocational School of Naci Topçuoğlu, University of Gaziantep, 83204 Gaziantep, Türkiye.

²Nutrition and Dietetics Department, Faculty of Health Science, İstanbul Arel University, 34010 İstanbul, Türkiye.

*E-posta: aysesevgili@gantep.edu.tr

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

Introduction

Food preservation by fermentation dates back thousands of years (Paul Ross et al., 2002). Fermentation is a process that aids in breaking big organic molecules into smaller ones through the action of microorganisms. For instance, proteins are changed into peptides and amino acids by microbial enzymes, while sugars and starches are transformed into acids and alcohol (Erkmen and Bozoglu, 2016). Fermented foods make up approximately 30% of the human diet (Ros et al., 2021). In Türkiye, mostly, bread and other fermented grain items are made from wheat. In Turkish culture, bread is very important in nutrition (Kabak et al., 2011). The use of sourdough, a traditional baking method, to make sourdough bread has gained popularity recently (Venturini Copetti, 2019; Amr and Alkhamaiseh, 2022; dos Santos et al., 2022). Sourdough bread can be classified as one of the most important food products among bakery products. The use of sourdough is responsible for leavening dough (Lau et al., 2021). One type of starting culture is sourdough that is made with water, flour (wheat or rye flour), and other ingredients by spontaneous fermentation of microflora (Rosenquist et al., 2000). The microflora of sourdough typically consists of yeasts, and heterofermentative and homofermentative lactic acid bacteria (LAB) (Ventimiglia et al., 2015). Environmental factors are significant for microbial growth and the development of microbiota in the sourdough. There are two categories for these variables: endogenous and exogenous. Endogenous factors are related to pH, water activity, oxidation-reduction potential, nutrients, antimicrobial compounds, and biological structures (Erkmen and Bozoglu, 2016). Exogenous factors are related to storage temperature, relative humidity of the environment, and the concentration of gases in the environment (Yadav et al., 2023). A few factors that influence the yeast diversity in sourdough include the kind of grain, leavening temperature, and dough moisture (Chavan and Chavan, 2011; Urien et al., 2019). Therefore, sourdough microflora differs from environment to environment.

Yeasts have an important role in the microbiome and nutrition of the human body. It seems that

the microbiota has a significant impact on both health and sickness (Flint, 2012). All the benefits of sourdough bread depend on the type of yeast genus and species. Therefore, knowing the type of yeast depending on the region provides information about the characteristics of sourdough bread and the selection of yeast culture to produce high-quality sourdough bread. It is intended to investigate the yeast map of sourdough bread due to its growing significance. This review focuses on the yeast map of sourdough microbiota in Türkiye and indicates regional differences and similarities of sourdough yeast microbiota. Among the screening techniques were full-text research articles, theses, and a project dealing with the production and isolation of yeasts from sourdough.

This study is aimed at contributing to the future study of topics such as microbiota-based nutritional diets, the relationship of human microbiota with health, and the effects of regionally dominant microbiota on our lives.

Literature Search Methodology

The timeline of literature review in this research was the initial isolation of yeasts from sourdough, using only the keywords “sourdough”, “yeast isolation from sourdough”, “sourdough microbiota”, “sourdough” and “yeast from sourdough”. Additional literature on these keywords was used only for limited and specific purposes used in sourdough bread production (flour microbes and other components). Peer-reviewed research was obtained from four databases: Google Scholar, Scopus, PubMed, and ScienceDirect. The search strategy included full-text research articles, theses, and projects in English and Turkish. Dataset lists all literature references related to and used in this review, which are included in the Reference section.

Type of Sourdough

Sourdough microflora mostly depends on the type of sourdough. Sourdough production depends on the use of yeast cultures. Depending on the type of sourdough bread, sourdough may

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

be classified into four groups. These are Type I, Type II, Type III, and Type IV. Type I is a traditional method in which microorganisms continuously multiply by replenishing (back-slopping) with fresh flour and water at regular intervals (Lau et al., 2021; Sevgili et al., 2021). The dominant yeasts of the species found in Type I sourdough are *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida humilis* (Siepmann et al., 2018). The accelerated sourdough is Type II in liquid form. This sourdough is an industrial process since it involves a single fermentation phase with just lactic acid bacteria (LAB) and yeasts, lasting 15 to 24 hours, followed by back-slopping ones (Yağmur et al., 2016; Sevgili et al., 2021). Type III sourdoughs are powdered, dry sourdoughs that are started by known starter cultures. When baking sourdough bread, they serve as additional acidifiers and scent carriers (De Vuyst and Neysens, 2005). Type IV is the combination of Types I and III. The process of fermentation is initiated by inoculating dough with a microbial starter and is then carried out daily by back-slopping. The dough can be either firm or semi-liquid. It is a common choice for laboratory investigations and is utilized by artisanal bakers most frequently (Catzeddu, 2019).

Properties of Yeasts in Sourdough Fermentation

Yeasts are eukaryotic, unicellular microfungi with significant contributions to the economy, environment, and medicine, and inhabit a broad range of ecological niches, primarily those found in water, soil, air, and on the surfaces of plants and fruits (Erkmen and Bozoglu, 2016). In wheat, rye, and sorghum sourdoughs, yeasts were discovered in levels ranging from 0.1 to 10% of the total counts of microorganisms (Stolz, 2003).

LAB and yeasts play a crucial role in the fermentation process of sourdough (Erkmen and Bozoglu, 2016). The main leavening agent in baked goods is carbon dioxide (CO₂), which is mainly produced by yeasts. The ability of yeasts to leaven food is higher than heterofermentative LAB. Yeasts prefer monosaccharide metabolism (Boudaoud et al., 2021). Additionally, yeasts may support both functional and nutritional characteristics such as the synthesis of vitamins,

phytase activity, and the development of phenolic compounds. Yeasts metabolize glucose, fructose, mannose, maltose, and sucrose in flour. They partially metabolize raffinose and do not use pentoses xylose or arabinose (Erkmen and Bozoglu, 2016). Remarkably, strains of *S. cerevisiae* that are used for sourdough have a higher growth rate on maltose, which helps them better adapt to the sourdough environment (Erkmen and Bozoglu, 2016; De Vuyst et al., 2021).

A combination of flour, LAB, and metabolically active yeast is essentially sourdough. The self-releasing dough softens and takes on a different scent after some time when it is allowed to evolve naturally without the addition of yeast. It's the flour, water, and microbes that produce these alterations in the dough. This dough is known as "sourdough" because it tastes sour and ferments on its own. LAB and yeasts are present in sourdough in different amounts and combinations. During the fermentation of sourdough, yeasts, and LABs maintain a symbiotic relationship. Bread's elasticity, acidity, and taste are all impacted by homofermentative LABs' fermentation of sugar to lactic acid. Dough blistering is caused by yeasts and heterofermentative LABs, which also release a lot of lactic acid and other volatile chemicals including CO₂, ethyl alcohol, and acetic acid (Erkmen and Bozoglu, 2016).

In recent years, the demand for sourdough bread production is increased owing to natural fermentation, delaying staling, enhancing flavor and aroma, high nutritional value, and healthy properties (Boyaci-gunduz, 2020; De Vuyst and Neysens, 2005). Yeasts ferment the carbohydrates in flour to produce CO₂ and ethanol. CO₂ acts as the primary leavening agent in bread products. Yeasts have a quick fermentation metabolism and can withstand many challenges while baking bread. Nowadays, yeasts play a major role in creating sourdough with better shelf life, osmotolerant qualities, activity retention at low temperatures, and taste production (Urien et al., 2019).

While ethanol strengthens the gluten network and affects the dough's characteristics, a significant amount of it evaporates during

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

baking. As sourdough osmoprotectants, succinate and glycerol both lower pH and affect dough rheology, enhancing gas retention. Yeasts may produce taste metabolites by changing amino acids into higher alcohols and their esters using the Ehrlich pathway (Pico et al., 2015). Additionally, yeasts can create several other metabolites such as ethanol, carbon dioxide, hydrogen peroxide, glutathione, acetic acid, glycerol, flavor compounds, enzymes and trace amounts of organic acids, such as succinic and acetic acids, which slightly acidify the leavened dough and change the final flavor of bread (Jayaram et al., 2013; Jayaram et al., 2014). The antifungal activities of yeast are due to the generation of ethyl acetate and releasing phenolic compounds (De Vuyst and Neysens, 2005). Furthermore, following the breakdown of the cell wall, yeasts can release conjugated and bound phenolic acids into free forms, which increases the polyphenol content in cereal products (Palla et al., 2020).

Yeasts in sourdough (SD) show phytase activities that contribute to improving the minerals' bioavailability (magnesium, calcium, iron, and zinc) by breaking down the phytate-mineral complex, which is an antinutritional factor abundant in wholemeal flours. Another activity related to the metabolism of yeasts in sourdough is their ability to increase the content of vitamin B2 (riboflavin) and vitamin D in sourdoughs specifically by *S. cerevisiae*. The concentration of vitamin B9 increases during SD fermentation of oats, barley, and rye, particularly by the presence of *S. cerevisiae* and *Kazachstania humilis* as starter cultures. Yeasts also improve the digestibility of sourdough bread with the production of proteases in sourdough; the proteolysis releases small peptides and free amino acids that are critical for rapid microbial growth, flavor development, and protein digestibility. Additionally, this proteolytic activity might decrease some allergen components, such as gluten (Perez-Alvarado et al., 2022).

In sourdough fermentation, *S. cerevisiae* is relatively acid-tolerant and maltose-positive. It can create an anaerobic environment with CO₂ production that could offer the ideal environment to support *Lactobacillus*

sanfranciscensis and *Lactobacillus plantarum* growth compared to aerobiosis (De Vuyst et al., 2021). Similarly, *S. cerevisiae* consumes lactic acid in a dough environment, which delays the acidification brought by LAB and allows the LAB to grow longer in sourdough (Sieuwets et al., 2018). The mutual relationship between *Kluyveromyces humilis* and obligately heterofermentative LAB is facilitated by cross-feeding in which obligately heterofermentative LAB hydrolyzes maltose, releasing glucose that becomes readily available for fermentation by maltose-negative *K. humilis* (Carbonetto et al., 2020). *Kluyveromyces unispora* is characterized by restricted substrate utilization, only consuming glucose and fructose. However, its growth in the presence of fructose was higher compared to *S. cerevisiae*. Furthermore, the incapability to ferment maltose can be regarded as a favorable trait in sourdoughs. This is because the yeasts can establish a nutritional mutualism with maltose-positive LAB. It is important to maintain objectivity and avoid subjective evaluations (Korcari et al., 2021). Different types of sourdough yeasts can be classified as maltose-positive and maltose-negative. Through the Emden-Meyerhof-Parnas pathway, maltose-negative yeasts convert glucose into ethanol predominantly. Commonly, sourdough carbohydrates are utilized by maltose-positive yeasts (De Vuyst et al., 2009).

Sourdough Yeast Microbiota and Map

The most common media used in the isolation of yeasts from sourdough in Türkiye were Malt Extract Agar acidified with 10% lactic acid, Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar, Malt Extract Broth, yeast extract peptone Dextrose (YPD) broth and Potato Dextrose Agar with incubation at 25-28°C for 1-5 days. The first yeast isolation from sourdough was performed by Özçelik (2000), and from the sourdough samples, 37 different yeast species were identified.

The regional distribution of the gathered sourdoughs, isolated yeasts, and their references is given in Table 1. A total of 746 yeast isolates were isolated in all of the regions. However, 241 isolates were not determined according to region by Karaman et al. (2018), Boyacı-Gunduz and

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

Erten (2020), and Aydın et al. (2022) (the yeasts other than *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii*) were not identified. A higher number of samples (44) was collected from the Central Anatolia region, and the number of yeast isolates was 137. The lowest number of samples (14) were obtained from the Marmara region, and the

number of yeast isolates was 23. In general, there are either the same or less distinct yeast species isolated from a single sourdough as there are LAB species. Additionally, a single bakery sourdough typically contains at least one or two yeast species (De Vuyst and Neysens, 2005).

Table 1. The regional distribution of the gathered sourdoughs and isolated numbers of yeast in Türkiye

Region	Sourdough numbers of sample	Isolated* numbers of yeast	References
Black Sea	33	93	Aydın et al., 2022; Arici et al., 2018; Karaman et al., 2018; Konuralp, 2020; Yağmur et al., 2016.
Aegean Sea	29	83	Aydın et al., 2022; Bakırcı and Köse, 2017; Karaman et al., 2018; Konuralp, 2020; Yağmur et al., 2016.
Mediterranean Sea	38	112	Aydın et al., 2022; Arici et al., 2018; Boyacı-Gunduz and Erten, 2020; Gül et al., 2005; Karaman et al., 2018; Yağmur et al., 2016.
Marmara	14	23	Aydın et al., 2022; Karaman et al., 2018; Konuralp, 2020.
Central Anatolia	44	137	Aydın et al., 2022; Konuralp, 2020; Sevgili et al., 2021; Yağmur et al., 2016.
Southeast Anatolia	31	50	Aydın et al., 2022; Karaman et al., 2018; Sevgili et al., 2021.
Unknown region	-	241	Karaman et al., 2018; Boyacı-Gunduz and Erten, 2020; Aydın et al., 2022.
Total	189	739	

The pie chart that displays identified yeasts from isolated sourdoughs in Türkiye is seen in Figure 1. According to this, *S. cerevisiae* (397 isolates) was the most isolated species of yeast, the other most isolated yeasts were *Saccharomyces* sp. (21 isolates), *Pichia guilliermondii* (14 isolates), and *Torula delbrueckii* (14 isolates). *Pichia kudriavzevii* was identified 12 isolates throughout the region. In addition, *Debaromyces hansenii* (7 isolates), *Kluyveromyces marxianus* (5 isolates), and *Torula holmii* (4 isolates) were identified. Each of *C. humilis*, *Geotrichum candidum* and *Wickerhamomyces anomalus* were detected as 3 isolates. Each of *K. humilis*, *K. unispora*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis* were identified as two isolates.

The maps showing the regional distribution of identified yeasts are given in Figure 2. In the Black Sea region, *S. cerevisiae* and *Torula delbrueckii* were isolated and identified as 83 and 10 isolates, respectively. In the Central Anatolia region, *S. cerevisiae* (107 isolates), *P. kudriavzevii* (9 isolates), *P. guilliermondii* (8 isolates), *K. marxianus* (4 isolates), *Geo. candidum* (3 isolates), *K. unispora* (2 isolates), *Galactomyces candidum* (*Gal. candidum*) (1 isolate), *Candida keyfr* (1 isolate), *W. anomalus* (1 isolate) and *Pichia fermentans* (1 isolate) were identified. In the Mediterranean Sea region, *S. cerevisiae* (81 isolates), *Saccharomyces* spp. (21 isolates), *T. holmi* (4 isolates), *P. guilliermondii* (2 isolates), *C. parapsilosis* (2 isolates), *S. delbrueckii* (19 isolates), and *T. unispora* (1

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

isolate) were identified. In the Southeastern Anatolia region, *S. cerevisiae* (39 isolates), *P. kudriavzevii* (3 isolates), *W. anomalus* (2 isolates), *K. humilis* (2 isolates), *C. glabrata* (2 isolates), *C. tropicalis* (1 isolate) and *K. marxianus* (1 isolate) were identified. In the

Aegean Sea region, *S. cerevisiae* (64 isolates), *Deb. hansenii* (7 isolates), *T. delbrueckii* (4 isolates), *P. guilliermondii* (4 isolates), and *C. humilis* (3 isolates) were identified. Only 23 *S. cerevisiae* were identified from the Marmara region

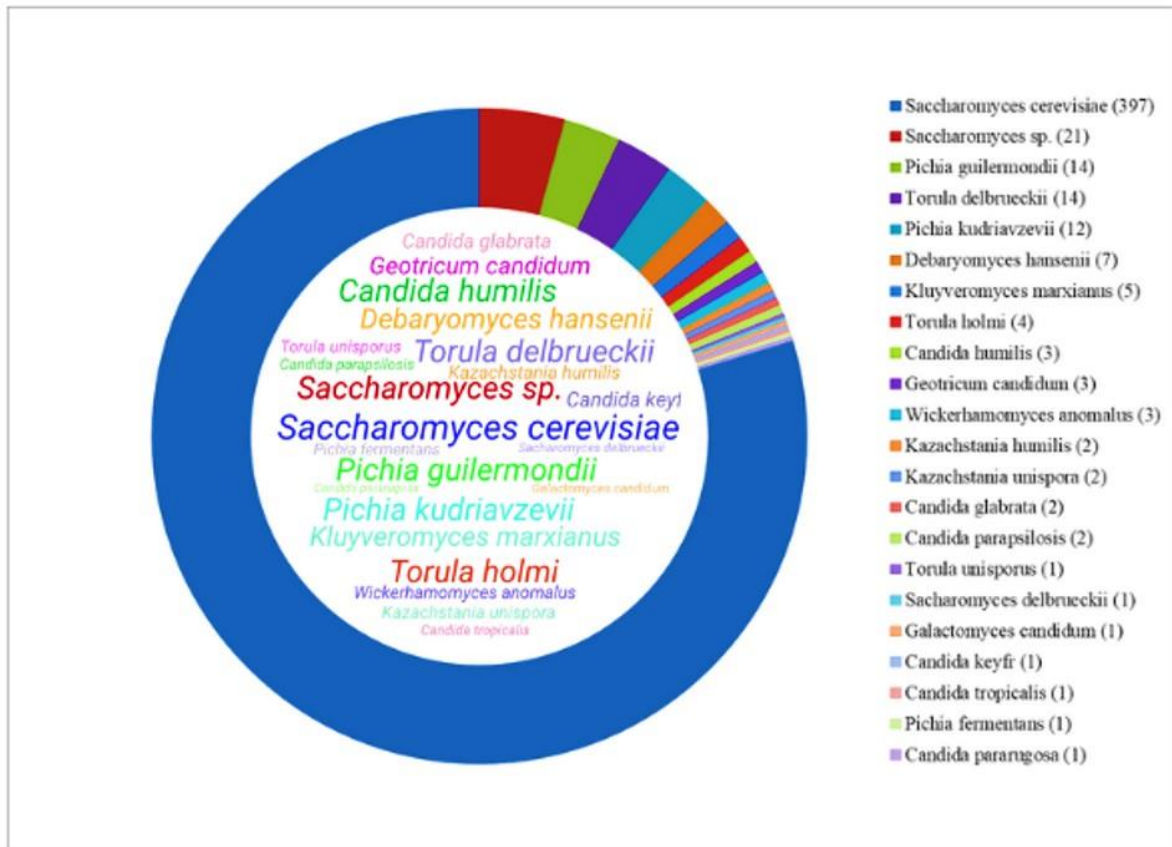


Figure 1. The pie chart displaying isolated yeasts from sourdoughs in Türkiye

Arici et al. (2018) obtained ten sourdough samples from the Black Sea region (Trabzon and Safranbolu) and the Mediterranean region (Isparta) cities. In their laboratory, two sourdoughs were made by the procedure used by artisan bakeries. Wheat flour (from Istanbul) and tarhana were used to produce sourdough. FTIR spectroscopy and 26S rDNA sequencing were used to isolate and identify 26 yeast species. In this research, only two yeast species were isolated from sourdough of the Black Sea and Mediterranean regions: *S. cerevisiae* (13 isolates) and *T. delbrueckii* (6 isolates).

Özçelik (2000) and Gül et al. (2005) obtained ten and fourteen sourdough samples from Isparta. Thirty-seven yeasts were identified by morphological, physiological, and biochemical tests. Most of the isolates were *S. cerevisiae*, which made up 27% (10 isolates) of the isolates and the others were *Torulopsis holmii* (4 isolates), *S. delbrueckii* (one isolate), and *T. unisporus* (one isolate). The other isolates were identified as *Saccharomyces sp.* (6 isolates). Ten sourdough samples were obtained from İzmir bakeries, and using the Vitek-2 Compact instrument, four distinct yeast species were detected: *D. hansenii* (7 isolates), *S. cerevisiae*

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

(5 isolates), *C. humilis* (3 isolates), and *T. delbrueckii* (1 isolate) (Bakırcı and Köse, 2017). Thirty-six sourdough samples were obtained from each of the cities Gaziantep, Mardin, and Konya, and 40 yeasts were identified by MALDI-TOF-MS (Sevgili et al., 2021) and PCR (Sevgili, 2023). *P. kudriavzevii* (7 isolates), *K. marxianus* (4 isolates), *G. candidum* (3 isolates), *K. unispora* (2 isolates), *G. candidum* (one isolate), *Candida kefyr* (one isolate) were

identified from Konya sourdoughs. *P. kudriavzevii* (3 isolates), *S. cerevisiae* (3 isolates), *W. anomalus* (2 isolates), *K. humilis* (2 isolates), *C. glabrata* (2 isolates), and *C. tropicalis* (one isolate) were identified from Gaziantep sourdoughs. *S. cerevisiae* (8 isolates) and *K. marxianus* (one isolate) were identified from Mardin sourdoughs. More yeast species were isolated from Konya sourdoughs, while *S. cerevisiae* was not isolated.

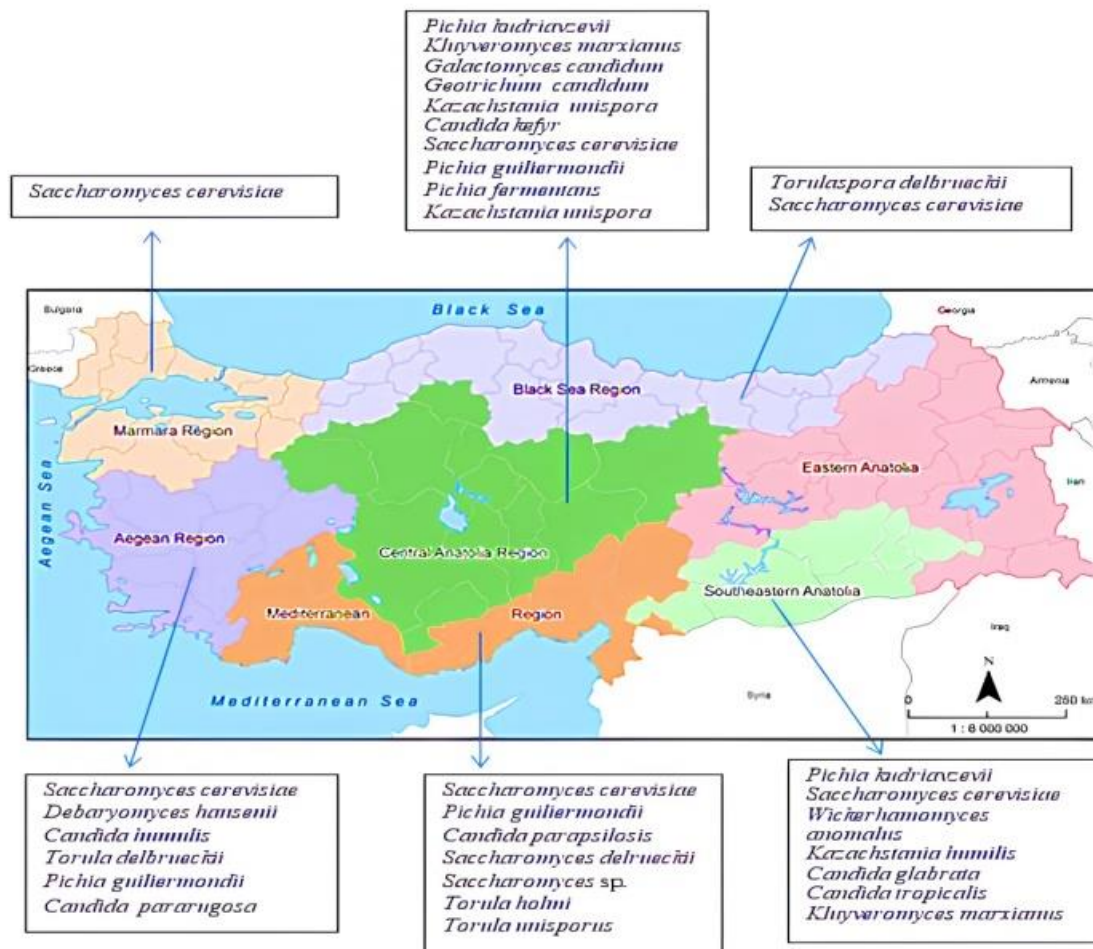


Figure 2. The map showing the regional distribution of identified yeasts

Yeast isolation was made from sourdoughs prepared from wheat flour obtained from 6 different regions of Türkiye. Sourdoughs (from Ankara) and wheat flour (from Izmir, Düzcce, Balıkesir, Bolu, Konya, Kastamonu) were used to isolate yeast species, and using MALDI-TOF

MS, yeast species were identified (Konuralp, 2020). *S. cerevisiae* was isolated from Ankara (2 isolates), Izmir (4 isolates), Düzcce (one isolate), Balıkesir (one isolate), Konya (one isolate), and Bolu (one isolate). One species of *P. fermentans* and *W. anomalus* were isolated from Ankara.

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

Karaman (2017) and Karaman et al. (2018) studied the isolation of yeasts from 33 sourdoughs obtained from different cities (Trabzon, Adıyaman, Gaziantep, Ankara, Mersin, İstanbul, Kayseri, Isparta, and Manisa) in Türkiye. Fourty isolates were determined and these isolates were *S. cerevisiae* (36), *S. pastorianus* (1 isolate), *C. glabrata* (1), *K. lactis* (1 isolate), and *P. membranifaciens* (1 isolate) (Karaman et al., 2018). However, yeast distribution according to the province was not indicated in their studies.

Different yeast species were identified from sourdoughs obtained from Trabzon (2 samples), Kütahya (2 samples), Isparta (1 sample), Ankara (2 samples), and Adana (1 sample) by RFLP-PCR. The predominant species, *S. cerevisiae* (58 isolates), was found in every sourdough sample. *P. guilliermondii* was the second most often isolated species with 14 isolates except for the Trabzon sourdoughs. *Torulaspora delbrueckii* (7 isolates) were isolated from four sourdoughs (two from Trabzon and two from Kütahya). *C. parapsilosis* (2 isolates) was isolated from Adana. *C. pararugosa* (one isolate) was isolated from one Kütahya sourdough (Yağmur et al., 2016).

A total of sixty-five samples of sourdough were gathered from the Central Anatolia (20 isolates), the Black Sea (15 isolates), the Mediterranean (10 isolates), the Aegean (10 isolates), the Southeast Anatolia (5 isolates), and the Marmara (5 isolates) regions. *S. cerevisiae* (290 isolates), *K. servazzii* (23 isolates), *K. humilis* (11 isolates), *W. anomalus* (10 isolates), *T. delbrueckii* (9 isolates), and *P. kudriavzevii* (2 isolates) were identified by SCOT-PCR analyses. Endogenous *S. cerevisiae* (290 isolates) were isolated: 90 from the Central Anatolia region, 60 from the Black Sea region, 48 from the Mediterranean region, 42 from the Aegean region, 22 from the Marmara region, and 28 from the Southeastern region. *P. kudriavzevii* was identified only from the Central Anatolia region (Aydm et al., 2022). However, for the other yeasts distribution by province was not shown in their study.

Eight sourdough samples (wholemeal wheat and rye sourdough) were obtained from Antalya, Mersin, and Ankara (Boyacı-Gunduz and Erten, 2020). Yeast species were identified by the PCR

method. They isolated *S. cerevisiae* (106), *K. bulderi* (11), *P. fermentans* (9), *P. membranifaciens* (8), *K. servazzii* (7), *K. unispora* (4), and *Hanseniaspora valbyensis* (3) from the sourdoughs. The most commonly isolated yeast species were *S. cerevisiae*. However, the yeast distribution according to the province was not indicated in their study.

The first sourdough-specific yeast species isolated from spontaneous sourdoughs *K. exigua* (synonym: *Saccharomyces exigua*) by De Vuyst et al., (2016). The most common yeast species from sourdoughs were *S. cerevisiae*, *C. humilis*, *P. kudriavzevii*, *K. exigua*, *T. delbrueckii*, *C. colliculosa*, and *W. anomalus* (Stolz, 2003). Huys et al. (2013) isolated *S. cerevisiae*, *C. humilis*, *P. kudriavzevii*, *K. exigua*, *T. delbrueckii*, and *W. anomalus* from sourdoughs. De Vuyst et al., (2021) have also isolated several yeast species from sourdough, but among them, only *K. exigua*, *C. humilis*, and *C. krusei* species are thought to be fundamental in the fermentation process. Arora et al. (2021) reported 312 research articles about the microbiological and biochemical characterization of sourdough in the world. They indicated 80 yeast species found throughout the world for sourdough. They mainly belong to *Saccharomyces*, *Candida*, *Kazachstania*, *Torulopsis*, *Yarrowia*, and *Pichia* genera. In another study (Pulvirenti et al., 2004), the most common yeast species isolated from sourdoughs are *S. cerevisiae*, *Candida krusei*, *Kazachstania exigua*, *Pichia anomala*, *Pichia subpelliculosa*, *K. exigua*, *Candida holmii* (synonym: *Torulaspora holmii*) and *C. humilis*. In Türkiye, 8 research articles, one project, and 4 theses were produced on isolation from the literature about the isolation and identification of yeast species from sourdoughs. The genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Torula*, and *Pichia* was the most frequently targeted, and the most study isolated *S. cerevisiae*.

Based on a study of 287 sourdough recipes published since 1971, the most often occurring yeast species in spontaneously formed stable sourdoughs are listed below (in decreasing order of abundance): *S. cerevisiae*, *C. humilis*, *W. anomalus*, *T. delbrueckii*, *K. exigua*, *P. kudriavzevii*, and *C. glabrata* (De Vuyst et al.,

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

2016). Certain yeast species, like *W. anomalus*, must be regarded as generalists as they can survive in a variety of microbiological environments (Daniel et al., 2011); others, like *C. humilis* and *K. exigua*, are well suited to the

sourdough samples collected from different regions of Türkiye. The literature shows that the highest species were isolated from the Central Anatolia Region, the Mediterranean Sea, and the Aegean Region. The most commonly isolated yeast is *S. cerevisiae* in all regions. *T. delbrueckii* and *P. guilliermondii* are the most isolated yeasts after *S. cerevisiae*. Yeast is a significant component for sourdough bread production. Sourdough bread will also have an important place in nutrition and human microbiota. It is predicted that the difference in nutrition of

sourdough habitat and its surroundings (Lhomme et al., 2016).

Conclusion

This study reviewed the sourdough microbiota reported in the literature, which originated from people in different regions may have an impact on the microbiota. For this reason, bread, which has an important and leading place in nutrition in Türkiye, is a matter of curiosity. The increasing demand for healthy foods in recent years has sparked interest in sourdough microbiota with beneficial metabolic properties. This research will provide favorable information about the origins of the most favorable yeasts that can be used for more healthful sourdough bread production.

References

- Amr, A.S., Alkhamaiseh, A.M. (2022). Sourdough use in bread production: Review. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 18(2):81-97.
- Arici, M., Ozulku, G., Yildirim, R. M., Sagdic, O., Durak, M. Z. (2018). Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. *Food Science and Biotechnology* 27(2):499-508.
- Arora, K., Ameer, H., Polo, A., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Gobbetti, M. (2021). Thirty years of knowledge on sourdough fermentation: A systematic review. *Trends in Food Science & Technology* 108:71-83.
- Aydın, F., Özer, G., Alkan, M., Çakır, İ. (2022). Start Codon Targeted (SCoT) markers for the assessment of genetic diversity in yeast isolated from Turkish sourdough. *Food Microbiology* 107:104081.
- Bakırcı, F., & Köse, E. (2017). Ekşi hamurlardan laktik asit bakterileri ve mayaların izolasyonu ve tanımlanması. *Akademik Gıda* 15(2):149-154.
- Boyacı-Gunduz, C. P., & Erten, H. (2020). Predominant yeasts in the sourdoughs collected from some parts of Türkiye. *Yeast* 37:449-466.
- Boudaoud, S., C. Aouf, H. Devillers, D. Sicard, and D. Segond. (2021). Sourdough yeast-bacteria interactions can change ferulic acid metabolism during fermentation. *Food Microbiology* 98:103790.
- Carbonetto, B., Nidelet, T., Guezenec, S., Perez, M., Segond, D., Sicard, D. (2020). Interactions between *Kazachstania humilis* yeast species and lactic acid bacteria in Sourdough. *Microorganisms* 8:240.
- Catzeddu, P. (2019). Sourdough Breads: *Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention*. V.R. Preedy and R.R. Watson (Ed.), 177-188, Elsevier Inc., Chichester.
- Chavan, R.S., Chavan, S.R. (2011). Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(3), 169-182.
- Daniel, H.M., Moons, M.C., Huret, S., Vrancken, G., De Vuyst, L. (2011). *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:63-73.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S. (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology* 26(7):666-675.
- De Vuyst, Luc, Comasio, A., Kerrebroeck, S.V. (2021). Sourdough production: fermentation strategies, microbial ecology, and use of non-

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

- flour ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 63(15):2447-2479.
- De Vuyst, Luc, Harth, H., Van Kerrebroeck, S., Leroy, F. (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology* 239:26-34.
- De Vuyst, L., Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: Biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology* 16(1-3):43-56.
- Dos Santos, A.C.K., Miyasaki, I.S., Adam, K.L., Cardoso, L.A.C. (2022). Starter culture for use in sourdough bread making: A review. *Journal of Agricultural Sciences Research* 2(2):2-11.
- Erkmen, O., Bozoglu, T.F. (2016). *Food Microbiology Principles into Practice. Volume 2: Microorganisms in Food Preservation and Processing*. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester.
- Flint, H.J. (2012) The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition Reviews* 70(Suppl. 1): S10-13.
- Gül, H., Özçelik, S., Sagdiç, O., Certel, M. (2005). Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Process Biochemistry* 40(2):691-697.
- Huys, G., Daniel, H.-M., De Vuyst, L. (2013). Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria: *Handbook Sourdough Biotechnology*. M. Gobetti, M. Ganzle (Ed.), 105-154, Springer, New York.
- Jayaram, V. B., Cuyvers, S., Lagrain, B., Verstrepen, K. J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2013). Mapping of *Saccharomyces cerevisiae* metabolites in fermenting wheat straight-dough reveals succinic acid as pH-determining factor. *Food Chemistry*, 136(2), 301–308.
- Jayaram, V. B., Cuyvers, S., Verstrepen, K. J., Delcour, J. A., & Courtin, C. M. (2014). Succinic acid in levels produced by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during fermentation strongly impacts wheat bread dough properties. *Food chemistry*, 151, 421-428.
- Kabak, B., Dobson, A. D. W. (2011). An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Türkiye. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51(3):248-260.
- Karaman, K., Sagdic, O., Durak, M. Z. (2018). Use of phytase active yeasts and lactic acid bacteria isolated from sourdough in the production of whole wheat bread. *LWT-Food Science and Technology* 91(August 2017):557-567.
- Karaman, K. (2017). Isolation of high phytase active yeasts and lactic acid bacteria from sourdough and their usage in the production of whole wheat bread. Ph.D. Thesis, Department of Food Engineering, Institute of Natural and Applied Sciences, Erciyes University, Kayseri.
- Konuralp E. (2020). Determination of some technological and immunogenic properties of endogenous yeasts isolated from sourdoughs produced from different regions' wheat flours. M.Sc. Thesis, Department of Food Engineering, Institute of Natural and Applied Sciences, Hacettepe University, Ankara.
- Korcari, D., Ricci, G., Capusoni, C., Fortina, M.G. (2021). Physiological performance of *Kazachstania unispora* in sourdough environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 37(5):88.
- Lau, S.W., Chong, A. Q., Chin, N.L., Talib, R.A. (2021). Sourdough microbiome comparison and benefits. *Microorganisms* 9(7):1355.
- Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., Sicard, D. (2016). Sourdough microbial community dynamics: an analysis during Franch organic bread-making processes. *Food Microbiology* 53:41-50.
- Özçelik, S. (2000). Isparta yöresinde kullanılan ekşi mayanın bileşimi, bazı biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinin araştırılması ve ekmek yapımında kullanılması. *Agriculture Forestry and Food Technologies Research Grand Committee, Türkiye Agricultural Research project (TOGTAG-2309)*, 2000, 21p.
- Palla, M., Blandino, M., Grassi, A., Giordano, D., Sgherri, C., Quartacci, M.F., Reyneri, A., Agnolucci, M., Giovannetti, M. (2020). Characterization and selection of functional yeast strains during sourdough fermentation

Yeasts Microbiota and Map of Sourdoughs from Türkiye: A Review

- of different cereal whole grain flours. *Scientific Reports* 10(1):12856.
- Paul Ross, R., Morgan, S., Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79(1-2):3-16.
- Pérez-Alvarado, O., Zepeda-Hernández, A., Garcia-Amezquita, L.E., Requena, T., Vinderola, G., García-Cayuela, T. (2022). Role of lactic acid bacteria and yeasts in sourdough fermentation during breadmaking: Evaluation of postbiotic-like components and health benefits. *Frontiers in Microbiology* 13(September):1-15.
- Pico, J., Bernal, J., Gómez, M. (2015). Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review. *Food Research International* (Ottawa, Ont.) 75:200-15.
- Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P. (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology* 38(2):113-117.
- Stolz, P. (2003). Biological fundamentals of yeast and Lactobacilli fermentation in bread dough: *Handbook of Dough Fermentations*. 25-47, CRC Press, Boca Raton.
- Ros, A. Da, Polo, A., Rizzello, G., Acin-albiac, M., Montemurro, M., Cagno, D. (2021). Feeding with sustainably sourdough bread has the potential to promote the healthy microbiota metabolism at the colon level. *Microbiology Spectrum* 9(3): e00494-21.
- Rosenquist, H., Hansen, Å. (2000). The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiology* 17(3):241-250.
- Sieuwert, S., Bron, P. A., Smid, E. J. (2018). Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. *LWT-Food Science and Technology* 90:201-206.
- Sevgili, A., Erkmen, O., Koçaslan, S. (2021). Identification of lactic acid bacteria and yeasts from traditional sourdoughs and sourdough production by enrichment. *Czech Journal of Food Sciences* 39(4):312-318.
- Sevgili A. (2023). Identification of lactic acid bacteria and yeasts from traditional sourdoughs and sourdough production by enrichment. Ph.D. Thesis, Department of Food Engineering, Graduation School of Natural and Applied Sciences, Gaziantep University, Gaziantep.
- Siepmann, F.B., Ripari, V., Waszczynskyj, N., Spier, M.R. (2018). Overview of sourdough technology: From production to marketing. *Food and Bioprocess Technology* 11(2):242-270.
- Urien, C., J. Legrand, P. Montalent, S. Casaregola, and D. Sicard. (2019). Fungal species diversity in French bread sourdoughs made of organic wheat flour. *Frontiers in Microbiology* 10:201.
- Ventimiglia, G., Alfonzo, A., Galluzzo, P., Corona, O., Francesca, N., Caracappa, S., Moschetti, G., & Settanni, L. (2015). Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Food microbiology*, 51, 57-68.
- Venturini Copetti, M. (2019). Yeasts and molds in fermented food production: an ancient bioprocess. *Current Opinion in Food Science* 25:57-61.
- Yadav, P., Lodhi, S. and Chauhan, A.K.S. (2023). Genomics: A Complete Genome Sequence: *Life Sciences: Trends and Technology*. P. Shankarishan (Ed.), 79-86, Scien Publications, India.
- Yağmur, G., Tanguler, H., Leventdurur, S., Elmaci, S.B., Turhan, E.Ü., Francesca, N., Settanni, L., Moschetti, G., Erten, H. (2016). Identification of predominant lactic acid bacteria and yeasts of Turkish sourdoughs and selection of starter cultures for liquid sourdough production using different flours and dough yields. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 66(2):99-107.



Araştırma Makalesi

**Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan
Gübresinin Etkisi**

Hatice BİLİR EKBIÇ^{1*}, Mert İLHAN¹

ÖZ

Bu çalışmada solucan gübresinin tuz stresi koşullarındaki 1103 P ve 110 R asma anaçları üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmada bazı sürgün ve kök gelişimi parametreleri ile bazı fizyolojik parametrelerde inceleme yapılmıştır. Tuz stresine tabii tutulan her iki anaçta özellikle kök kuru ağırlığı ve kök tolerans oranı değerlerinde azalma belirlenmiş, zarar derecesi ve hücre zarı zararlanma oranı değerlerinde de artış saptanmıştır. 1103 P anacı, 110 R anacına göre çoğu bitki gelişim parametreleri açısından daha üstün sonuçlar göstermiştir. İncelenen çoğu parametreler açısından vermikompostun 1103 P anacında daha etkin olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara dayalı olarak 110R anacına kıyasla 1103P anacının tuz stresine daha dayanıklı olduğu ve tuzlu şartlarda vermikompost kullanımıyla bitkilerin tuz stresinden daha az olumsuz etkilenebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Asma anacı, tuz stresi, vermikompost

**Effect of Vermicompost on Salt Stress Tolerance of Different Grapevine
Rootstocks**

ABSTRACT

In this study, effect of vermicompost on 1103 P and 110 R grapevine rootstocks in salt stress conditions was investigated. Some shoot and root growth parameters and some physiological parameters were investigated in this experiment. In both rootstocks subjected to salt stress, especially root dry weight and root tolerance rate values were decreased and the degree of damage and cell membrane damage rate values were increased. 1103 P rootstock showed superior results in terms of most plant growth parameters compared to 110 R rootstock. It was determined that vermicompost was more effective on 1103 P rootstock in terms of most parameters examined. Based on the findings, it was concluded that 1103P rootstock is more resistant to salt stress than 110R rootstock and plants can be less adversely affected by salt stress with the use of vermicompost under saline conditions.

Keywords: Grapevine rootstock, salt stress, vermicompost

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-2758-6713, 0000-0002-4560-4428

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 11.03.2024

Kabul Tarihi: 30.04.2024

¹ Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ordu

*E- posta: haticebilirekbic@gmail.com

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

Giriş

Kullanılabilir tarım alanları son yıllarda insan nüfusunun artışına yeterli düzeyde yanıt verememekte ve tarımda sürdürülebilirlik konusunda ciddi sıkıntılar yaşanmaktadır. Çevre kirliliği ile küresel ısınmaya bağlı su kaynaklarındaki azalma başta olmak üzere birçok faktörden kaynaklı mevcut tarım alanlarında tuzluluk ortaya çıkmaktadır (Shahbaz ve Ashraf, 2013). Abiyotik stres faktörleri içinde yer alan tuz stresi, kuraklıkla birlikte bitkiler açısından büyük problemlere neden olmaktadır. Tuzluluk, özellikle yağışların yetersiz olduğu ya da sulama imkanının kısıtlı olduğu bölgelerde önemli bir sorun haline gelmiştir (Yamaguchi ve Blumwald, 2005; Dardeniz ve ark., 2006; Müftüoğlu ve ark., 2006; Rao ve ark., 2006). Toprak ve sulama suyunda ki tuz yoğunluğunun artışına bağlı bitki gelişimi de olumsuz etkilenmektedir. Bitkilerde fotosentez dengesinin bozulmasına bağlı beslenme bozuklukları, sürgün gelişimindeki olumsuzluklar ve toksik etki sebebiyle hücrel büyümenin engellenmesi, tuz stresinin olumsuz etkilerindedir (Zhu, 2007). Asma (*Vitis vinifera* L.) geçmişte oldukça eski tarihlere dayanan ve yüksek ekonomik değere sahip bitkilerden birisi olarak bilinmektedir (Wang ve ark., 2021). Meyvelerinin sofralık tüketiminin yanı sıra şaraplık ve kurutulmalıkta da çok önemli bir değere sahip olan asma bitkisinde kaliteli ürün yetiştiriciliği büyük önem taşımaktadır. Ancak bağcılık yapılan alanlarda kuraklık ve beraberinde ortaya çıkan tuzluluk ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır (Walker ve ark., 2002; Golla, 2021). Tuzluluğa kısmen duyarlı olan asma bitkisinde verim ve kalite kayıplarının yanı sıra meyve suyu ve şarap kalitesinde bozulmalar da meydana gelebilmektedir (De Loryn ve ark., 2014). Bu olumsuz koşullar altında toprak yapısında bozulmalar oluşmakta ve buna bağlı asma bitkilerinde de gelişim gerilemesi gözlenmektedir. Günümüzde yetiştiricilik yapılan bağ alanlarındaki toprakların çoğu organik maddece fakirdir. Organik maddece zengin olmayan sentetik gübreler toprağın yapısal stabilitesini, fiziksel ve biyolojik özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Organik maddece zengin olan gübrelerin kullanımı

sürdürülebilirlik açısından önem taşımaktadır (Eyüpoğlu, 1998). Tuzluluk toprağı organik maddece fakirleştirmekte ve yapısal düzenini bozmaktadır. Bu yüzden organik atıklarla oluşturulmuş organik gübrelerin kullanımı toprak stabilitesi için oldukça önemlidir (Unagwu ve ark., 2013). Son zamanlarda Sentetik gübrelere göre organik gübrelerin daha ekonomik olduğu vurgulanmakta olup organik gübre kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Vermikompost, organik atıkların solucanlar tarafından parçalara ayrılmasıyla elde edilen gübrelerdendir (Ayyobi ve ark., 2014). Bu gübrelerdeki organik maddeler bitkiler için alınabilir formda olup aynı zamanda toprağın fizikokimyasal özelliklerini iyileştirirler (Atiyeh ve ark., 2000; Lordan ve ark., 2013). Vermikompostun bu avantajlarının yanında yapılan çalışmalarla farklı abiyotik streslere karşı da etkili olduğu bilinmektedir. Buna göre yalnızca meyve türleri arasında yer alan nar (Bidabadi ve ark., 2017) ile domates (Benazzouk ve ark., 2018), patates (Ezzat ve ark., 2019), marul (Kıran, 2019) ve fasulye (Beykkhormizi ve ark., 2016) gibi sebze türlerinde çalışmalar yürütülmüş olup bu az sayıda ki çalışmada vermikompostun tuz stresinin verdiği hasarları azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmaların ışığı altında yapılan bu denemede mevcut Amerikan asma anaçlarının tuz stresine karşı tepkileri ve vermikompostun (solucan gübresi) tuz stresine karşı etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak 110 R ve 1103 P Amerikan asma anaçlarının 2 gözlü odun çelikleri kullanılmıştır. Anaçlar, Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

Yöntem

Odun çelikleri uygulama zamanına kadar +4 °C'lik soğuk hava deposunda bekletilmiştir. Anaç çelikleri, dikim öncesi dip gözleri köreltilerek 2 gözlü şekilde hazırlanmıştır. Bitkilerin yetiştirilmesi için 14 litrelik saksılar kullanılmıştır. Denemede yetiştirme ortamı olarak, 1:1 oranında ki torf (T) + perlit (P) ve saksı hacminin %20'si olacak şekilde vermikompost (VK) eklenmiş torf + perlit

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

kullanılmıştır. Kullanılan solucan gübresi (vermikompost) %45 oranında organik madde, %1 oranında organik azot, %2-3 oranında toplam azot içermektedir. Kullanılan ortamın maksimum nem içeriği %35 olup 4 dS/m EC, 14.24 C/N oranı ve 7-9 arasında pH değerlerini içermektedir. Çeliklerin dikiminden köklü ve 4-5 yapraklı aşamaya gelene kadar tarla kapasitesinde sulama yapılmıştır. Uygulama için uygun şartları sağlayan bitkiler, tuzlu (NaCl⁺) ve tuzsuz (NaCl⁻) su uygulaması olacak şekilde 2 gruba ayrılmıştır. Araştırmada birçok bitki türünün yetiştiği topraklarda bitkilerin ürün verimini azaltan tuzluluğun üst sınır değeri olan 8 ds/m (5120 ppm) değeri dikkate alınmıştır (Neja ve ark., 1978; Kök, 2012; Bilir Ekbiç ve ark., 2020) Denemede kullanılan sulama suyu tuzsuz su sınıfına girmektedir. 8 haftalık deneme süresince bitkilere tarla kapasitesinde 1 hafta tuzlu ve takip eden haftada tuzsuz su uygulaması yapılmıştır. Deneme sonunda bitkilerde sürgün uzunluğu (cm), sürgün yaş ve kuru ağırlığı (g), boğum ve yaprak sayısı (adet), kök yaş ve kuru ağırlığı (g), kök uzunluğu (cm), kök sayısı (adet), kök tolerans oranı (KTO), iyon akışı (%), hücre zarı zararlanma oranı (%), klorofil miktarı (SPAD), yaprak oransal su kapsamı (YOSK), yaprak alanı (cm²) ve bitkilerdeki zararlanma derecesi (0-3) incelenmiştir. Çalışmada sürgün ve kök uzunlukları cetvel yardımıyla, sürgün üzerindeki yaprak ve boğum sayıları ise adet olarak belirlenmiştir. Sürgün, köklerin yaş/kuru ağırlıkları ± 0.001 g hassasiyetindeki terazide (Radwag WTB200) ölçülmüştür. Sürgün ve kök kuru ağırlıkları ise etüvde (Memmert UN55) 65 °C'de 72 saat kurutulması sonrası tartılarak belirlenmiştir. Tuz stresine tabii tutulan bitkilerin kök tolerans oranları (TO) belirtilen formüle göre hesaplanmıştır. TO: T_x/T_o Tx: Belli konsantrasyonda NaCl uygulanmış bitkilerin kök kuru ağırlıkları (g), To: NaCl uygulanmamış bitkilerin kök kuru ağırlıkları (g). Zararlanma derecesi için Martinez Barraso ve Alvarez (1997)'in çilek bitkisi için oluşturduğu ve Bilir Ekbiç (2017) tarafından asma için modifiye edilen skaladan yararlanılmıştır. Bu skalaya göre tuzdan etkilenmeyen bitkiler '0 derece', yaprak uçlarındaki hafif kuruma ve nekroza sahip bitkiler '1.derece', yaprağın %50'sinden fazlasında zarar görülmüş ise

'2.derece' ve bitkinin ölümüne sebep olan nekrozlar ise '3.derece' olarak belirtilmiştir. Bitkilerden alınan 0.3 gramlık yapraklardan eşit parçalara bölünmüş örnekler 25 mm x 150 mm'lik cam tüplere konularak, üstüne 15 ml saf su ilave edilip, çalkalayıcıda 1 gün boyunca 100 rpm hızda çalkalanmıştır. Çalkalama işlemi bittikten sonra EC metre (HANNA HI 99300) ile belirlenen değer, EC₁ olarak belirlenmiştir. Daha sonra aynı örnekler oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek, EC₂ değeri tespit edilmiştir. Bu şekilde yapraklardaki iyon akışı $EC_1/EC_2 \times 100$ formülü kullanılarak belirlenmiştir (Özden ve ark., 2009). Yaprak klorofil içeriğinin belirlenmesi için klorofil metre (SPAD-502) kullanılmıştır. Hücre zarı zararlanma oranı, iyon akışı verileri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Dlugokecka ve Kacperska-Palacz, 1978; Fan ve Blake, 1994). $HZZO = [(1 - (1 - EC_1/EC_2) / (1 - EC^*1/EC^*2) \times 100]$, EC^{*1}: Kontrol grubunun EC değeri EC^{*2}: Kontrol grubunun EC değeri. Oransal su kapsamının tespiti için ise aşağıdaki formül kullanılmıştır. Yaprak Oransal Su Kapsamı (YOSK) (%): $[(YA - KA) \div (TA - KA) \times 100]$. Yaprak turgor ağırlıkları 6 saat saf suda bekletildikten sonra belirlenmiştir. Yaprak kuru ağırlıkları ise etüvde 80 °C sıcaklıkta 24 saat bekletme sonunda tespit edilmiştir. Yaprak alanı ölçümlerinde bitkilerin sürgünlerinin orta kısımlarından alınan yapraklar kullanılmıştır. Yaprak alanları tarayıcıda tarandıktan sonra 'Digimizer 4.0' programıyla cm² cinsinden hesaplanmıştır.

Deneme deseni ve istatistiksel analiz

Araştırma faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmıştır. Denemede her uygulama için 3 tekerrür ve her tekerrürde 10 adet 2 gözlü çelik olacak şekilde toplam 30 adet çelik kullanılmıştır. İstatistiki analiz %5 önem seviyesinde ve LSD testine tabii tutularak JMP 13.2.0 programında gerçekleştirilmiştir. Yüzde (%) değerleri, veri açısı transformasyonu (ARCSIN) uygulanarak analize alınmıştır.

Bulgular

Sürgün gelişim bulguları

Araştırmada kullanılan asma anaçlarının sürgün uzunluğu bakımından farkı istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (p<0.05). 110 R anacı

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

ortalama 21.91 cm sürgün uzunluğuna erişirken, 1103 P anacı ortalama 18.83 cm uzunluğunda sürgünler oluşturmuştur. Bitkilerin tuzlu su uygulamasına maruz kalması sürgün uzunluğunu azaltırken bu fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bitki yetiştirme ortamları açısından VK+T+P ortamı, T+P ortamına göre daha uzun sürgün oluşumu sağlamıştır. Böylelikle VK+T+P ortamında bitkiler ortalama 23.90 cm sürgün uzunluğuna sahipken, T+P ortamındaki bitkiler ortalama 16.84 cm uzunluğunda sürgün oluşturmuştur. A × NaCl interaksyonu incelendiğinde, gruplar arasında ki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Buna karşı A × O interaksyonu açısından sürgün uzunluğu gelişimi en iyi 1103 P × (VK+T+P) interaksyonundan (25.24 cm) elde edilmiştir. En düşük sürgün uzunluğu ise 1103 P × (T+P) interaksyonunda (15.10 cm) tespit edilmiştir. Tuzluluğun ortamlar bazındaki etkisine bakıldığında, en uzun sürgünler, tuzsuz su uygulama koşullardaki VK+T+P uygulamasından (25.96 cm) elde edilmiştir. Tüm faktörlerin ele alındığı, A × NaCl × O interaksyonu incelendiğinde en yüksek sürgün uzunluğu 1103 P × NaCl × (VK+T+P) grubundan (26.96 cm) elde edilmiştir. Sürgün gelişimi bakımından en zayıf gelişen interaksyon grupları ise aynı istatistiksel grupta yer alan 110 R × NaCl × (T+P) (13.93 cm) ve 110 R × NaCl × (T+P) (16.28 cm) olmuştur. Tuzluluk faktörü, bitki sürgün gelişim özelliklerinin hemen hemen hepsinde istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Anaçlar arasındaki fark ise sürgün yaş ve kuru ağırlığı özelliklerinde önemli olmuştur. Her iki parametrede de 1103 P anacı, 110 R anacına göre daha yüksek değerler göstermiştir. Kullanılan ortamlar bakımından VK+T+P ortamında yetiştirilen çelikler ortalama 4.63 g sürgün yaş ağırlığı ve 1.41 sürgün kuru ağırlığına ulaşmış ve T+P ortamına göre daha yüksek değerler göstermiştir. Bununla beraber A × NaCl interaksyonu bakımından en yüksek sürgün yaş ve kuru ağırlığı değerleri 1103 P anacından elde edilmiştir (Çizelge 1). A × O interaksyonu açısından ise en yüksek sürgün yaş ve kuru ağırlığına sahip çelikler VK+T+P ortamında tespit edilmiştir. A × NaCl × O etkileşimi ele alındığında, en yüksek sürgün yaş ağırlığı

değerleri 1103 P × NaCl × (VK+T+P) (5.90 g) ve 1103 P × NaCl × (VK+T+P) (5.77 g) gruplarında belirlenirken, en düşük sürgün yaş ağırlığı değeri, 110 R × NaCl × (T+P) uygulamasından (2.49 g) elde edilmiştir. Buna paralel olarak en yüksek sürgün kuru ağırlığı 1.74 g değeriyle 1103 P × NaCl × (VK+T+P) uygulamasında belirlenirken, en düşük sürgün kuru ağırlığı değeri (0.74 g), 110 R × NaCl × (T+P) uygulama grubundan elde edilmiştir. 1103 P anacı, 110 R anacına göre istatistiksel olarak daha fazla boğum ve yaprak sayısı oluşturmuştur (Çizelge 1). Tuzluluk faktörü, boğum ve yaprak sayısı bakımından istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Buna karşın T+P ve VK+T+P ortamında farklılıklar tespit edilmiştir. Hem boğum sayısı hem de yaprak sayısı açısından VK+T+P ortamında yetiştirilen bitkiler daha fazla yaprak ve boğum oluşturmuştur. Tuzluluğun anaçlara olan etkisi incelendiğinde ise en fazla yaprak sayısı her iki tuz koşulunda da 1103 P anacında belirlenmiştir. Buna karşın en düşük boğum sayısı (7.55 adet), tuzsuz su koşullarında yetiştirilen 110 R anacında tespit edilmiştir. Her iki anaçta kullanılan ortam faktörleri ele alındığında ortalama 10.48 boğum sayısı ve ortalama 10.96 yaprak sayısı ile en iyi interaksyonun 1103 P × (VK+T+P) olduğu belirlenmiştir. Kullanılan ortamlardaki tuz faktörü incelendiğinde ise tuz varlığı fark etmeksizin VK+T+P ortamındaki bitkiler istatistiksel olarak daha fazla yaprak ve boğum oluşturmuştur (Çizelge 1). Yaprak ve boğum sayısı açısından en iyi gelişim, ortalama 10.83 adet boğum ve 11.26 adet yaprak sayısı ile 1103 P × NaCl × (VK+T+P) interaksyon grubunda görülmüştür. Yaprak alanı bakımından A, O, A × O, NaCl × O ve A × NaCl × O interaksyonları, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Buna paralel olarak 1103 P anacı ortalama 34.77 cm² yaprak alanına ulaşırken, 110 R anacı ortalama 25.76 cm²'lik yaprak alanı oluşturmuştur. VK+T+P ortamında yetiştirilen çeliklerde yaprak alanı ortalama 33.34 cm² iken, T+P ortamındaki bitkilerde 27.20 cm² olmuştur. A × NaCl interaksyonu bakımından en yüksek yaprak alanı değeri 35.32 cm² ile 1103 P × NaCl grubundan elde edilmiştir. En düşük yaprak alanına sahip grup ise 110R × NaCl (23.80 cm²) olarak belirlenmiştir. Anaçlarla beraber ortam

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

faktörü ele alındığında VK+T+P ortamında yetiştirilen 1103 P anacı en yüksek yaprak alanına sahip grup olmuştur (Çizelge 1). Tüm faktörler göz önünde bulundurulduğunda hem

tuzlu (41.08 cm²) hem de tuzsuz su (40.22 cm²) şartlarında ve VK+T+P ortamında yetiştirilen 1103 P anacı çelikleri, en yüksek yaprak alanına sahip olmuştur.

Çizelge 1. Tuzlu ve tuzsuz su koşullarında vermikompostun 110 R ve 1103 P anacının sürgün gelişimi üzerine etkisi

Faktörler	İncelenen Özellikler					
	SU (cm)	SYA (g)	SKA (g)	BS (adet)	YS (adet)	YA (cm ²)
Anaç (A)						
110 R	21.91	3.24 b	1.01 b	8.08 b	8.30 b	25.76 b
1103 P	18.83	4.50 a	1.36 a	9.38 a	9.46 a	34.77 a
LSD _{%5}	Ö. D	0.75	0.20	1.00	0.87	4.76
NaCl						
NaCl ⁺	19.55	3.88	1.22	9.17	9.05	30.97
NaCl ⁻ (Kontrol)	21.19	3.86	1.14	8.29	8.71	29.56
LSD _{%5}	Ö. D	Ö. D	Ö. D	Ö. D	Ö. D	Ö. D
Ortam (O)						
T+P (Kontrol)	16.84 b	3.11 b	0.96 b	7.94 b	8.00 b	27.20 b
VK+T+P	23.90 a	4.63 a	1.41 a	9.52 a	9.76 a	33.34 a
LSD _{%5}	3.44	0.75	0.20	1.00	0.87	4.77
A x NaCl						
110 R x NaCl ⁻	19.45	3.23 b	0.89 b	7.55 b	8.13 b	23.80 c
110 R x NaCl ⁺	18.21	3.25 b	1.12 ab	9.61 ab	8.47 ab	27.72 bc
1103 P x NaCl ⁻	22.94	4.49 a	1.40 a	9.02 a	9.29 ab	35.32 a
1103 P x NaCl ⁺	20.89	4.51 a	1.33 a	9.73 a	9.63 a	34.22 ab
LSD _{%5}	Ö. D	1.07	0.29	1.41	1.23	6.75
A x O						
110 R x T+P	18.58 bc	3.05 b	0.87 b	7.60 b	8.04 b	25.51 b
110 R x VK+T+P	22.56 ab	3.43 b	1.14 b	8.56 b	8.55 b	26.02 b
1103 P x T+P	15.10 c	3.17 b	1.05 b	8.28 b	7.96 b	28.89 b
1103 P x VK+T+P	25.24 a	5.83 a	1.67 a	10.48 a	10.96 a	40.65 a
LSD _{%5}	5.04	1.07	0.29	1.41	1.23	6.75
T x O						
NaCl ⁻ X T+P	16.42 c	2.86 c	0.90 b	7.18 b	7.68 b	27.75 ab
NaCl ⁻ X VK+T+P	25.96 a	4.86 a	1.39 a	9.40 a	9.74 a	32.48 ab
NaCl ⁺ X T+P	17.27 bc	3.36 bc	1.03 b	8.70 a	8.33 b	26.64 b
NaCl ⁺ X VK+ T+P	17.27 ab	4.40 ab	1.42 a	9.64 a	9.77 a	34.19 a
LSD _{%5}	5.04	1.07	0.29	1.41	1.23	6.75
A x NaCl x O						
110 R x NaCl ⁻ x T+P	13.93 c	2.49 b	1.01 cd	6.43 d	7.43 b	22.87 b
110 R x NaCl ⁻ x VK+T+P	24.97 ab	3.96 b	1.04 cd	8.68 bc	8.83 b	24.74 b
110 R x NaCl ⁺ x T+P	16.28 c	3.60 b	0.74 d	8.78 bc	8.66 b	28.15 b
110 R x NaCl ⁺ x VK+T+P	20.14 abc	2.90 b	1.24 bc	8.44 bc	8.28 b	27.30 b
1103 P x NaCl ⁻ x T+P	18.91 bc	3.22 b	1.06 cd	7.93 cd	7.93 b	30.42 b
1103 P x NaCl ⁻ x VK+T+P	26.96 a	5.77 a	1.74 a	10.12 ab	10.65 a	40.22 a
1103 P x NaCl ⁺ x T+P	18.25 bc	3.11 b	1.04 cd	8.62 bc	8.00 b	27.36 b
1103 P x NaCl ⁺ x VK+T+P	23.53 ab	5.90 a	1.61 ab	10.83 a	11.26 a	41.08 a
LSD _{%5}	7.14	1.51	0.41	2.00	1.74	9.55

T: Torf, P: Perlit, VK: Vermikompost, NaCl⁻: Tuzsuz su (kontrol), NaCl⁺: Tuzlu su, SU: Sürgün uzunluğu, SYA: Sürgün yaş ağırlığı, SKA: Kök kuru ağırlığı, BS: Boğum sayısı, YS: Yaprak sayısı, YA: Yaprak alanı, A: Anaç, NaCl: Tuz, O: Ortam

Kök gelişim bulguları

Araştırmada incelemeye alınan tüm uygulama grupları bakımından elde edilen kök uzunluğu sonuçları istatistiksel olarak önemli

bulunmamıştır. İnteraksiyonlar ele alındığında VK+T+P ortamında yetiştirilen bitkilerde kök uzunluğu daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 2). Kök yaş ve kuru ağırlığı bakımından 1103P

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

anacı, 110 R anacına göre daha üstün sonuçlar göstermiştir. Tuzlu su uygulaması bitkilerde kök yaş ağırlığını istatistiksel olarak etkilemezken, kök kuru ağırlığında tuzlu suya maruz kalan bitkilerde daha düşük olmuştur. Kullanılan ortamlar bakımından kök yaş ve kuru ağırlığında elde edilen farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Ancak tuz faktörüyle beraber ortam faktörü ele alındığında bitkilerdeki kök kuru ağırlığı farkı önemli bulunmuştur. Buna göre en yüksek kök kuru ağırlığına sahip olan bitkiler $\text{NaCl}^- \times (\text{VK}+\text{T}+\text{P})$ interaksyonundan elde edilmiştir (1.05 g). Kök kuru ve yaş ağırlığı açısından tüm faktörler ele alındığında $\text{NaCl}^- \times 1103 \text{ P}$ bitkileri istatistiksel olarak en başarılı sonucu göstermiştir (Çizelge 2). Buna ek olarak kök sayısı parametresi incelendiğinde anaçlar arasındaki fark önemli bulunup, 1103 P anacı ortalama 8.99 kök sayısı ile 110 R anacına göre daha iyi gelişim göstermiştir. Tuzluluk ve ortam faktörleri kök sayısını istatistiksel olarak etkilememiştir. Bunun aksine $\text{A} \times \text{NaCl}$ interaksyonlarına bakıldığında hem tuzlu hem de tuzsuz su koşullarında 1103 P anacı daha yüksek kök sayısına sahip olmuştur (Çizelge 2). $\text{A} \times \text{O}$ interaksyonu açısından ise hem T+P ortamında hem VK+T+P ortamında 1103 P anacı daha üstün sonuçlar göstermiştir. Tüm faktörler göz önünde bulundurulduğunda en yüksek kök sayısı tuzlu su koşullarında VK+T+P uygulaması yapılan 1103 P anacından (9.82 adet) elde edilmiştir. En az kök sayısına sahip olan interaksyon ise $110 \text{ R} \times \text{NaCl}^+ \times \text{VK}+\text{T}+\text{P}$ (4.80 adet) olmuştur. Kök tolerans oranı parametresi incelendiğinde anaçlar ve kullanılan ortamlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Buna karşın tuz uygulamaları bitkilerin kök tolerans oranını azaltmıştır. Tuzlu suya maruz kalan bitkilerin kök tolerans oranı ortalama 0.77 iken, tuzsuz su uygulanan bitkilerin kök tolerans ortalaması 1.00 olarak belirlenmiştir. Kök tolerans oranı açısından 1103 P anacı, 110 R anacına göre daha düşük kök toleransına sahip olmuştur (Çizelge 2).

Fizyolojik parametre bulguları

Bitki yapraklarında ki klorofil içeriği bakımından anaçlar ve tuzluluğun etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Buna

karşın kullanılan ortamlar kıyaslandığında VK+T+P ortamındaki bitkilerin ortalama 27.44 SPAD değeriyle, T+P ortamındaki bitkilere nazaran daha fazla klorofil içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. $\text{A} \times \text{NaCl}$ uygulamasında ise en yüksek klorofil içeriği $1103 \text{ P} \times \text{NaCl}^+$ interaksyonundan (25.88) elde edilmiştir. Klorofil açısından kullanılan ortamlar kıyaslandığında her iki anaç içinde VK+T+P ortamı daha olumlu sonuçlar göstermiştir (Çizelge 3). $\text{O} \times \text{NaCl}$ interaksyonu açısından hem tuzlu hem tuzsuz su ile sulanan VK+T+P ortamında yetişen çeliklerin daha fazla klorofil içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. $\text{A} \times \text{NaCl} \times \text{O}$ interaksyonu incelendiğinde 29.21 SPAD değeriyle $110 \text{ R} \times \text{NaCl}^- \times (\text{VK}+\text{T}+\text{P})$ uygulaması en yüksek klorofil içeriğine ulaşmıştır. Buna karşın 110R anacının hem tuzlu hem de tuzsuz su şartlarında ki T+P ortamındaki yaprak klorofil içeriğinin en düşük miktarda olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Bitkilerde yaprak oransal su kapsamı içeriği incelendiğinde, özellikle $\text{A} \times \text{O}$ ve $\text{A} \times \text{NaCl} \times \text{O}$ interaksyonlarında farklılıklar tespit edilmiştir. Buna göre $\text{A} \times \text{O}$ faktörleri incelendiğinde VK+T+P ortamında yetiştirilen anaçlarda yaprak oransal su kapsamı en yüksek seviyelerde belirlenmiştir. En yüksek yaprak oransal su kapsamı VK+T+P ortamında yetiştirilen 110R anacında tespit edilmiştir. Üçlü interaksyonlar incelendiğinde, $110 \text{ R} \times \text{NaCl}^+ \times (\text{VK}+\text{T}+\text{P})$ interaksyonu en yüksek yaprak oransal su kapsamı değerine (% 92.18) ulaşmıştır. Bitkilerde tuz stresinden kaynaklı zarar derecesi açısından anaçlar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 110 R anacı 0.36 zarar derecesine sahipken, 1103 P anacının 0.05 zarar derecesinde olduğu tespit edilmiştir. Bitkilerin tuzlu suya maruz kalmasıyla beraber zararlanmanın da artış gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte tuzsuz su uygulanan bitkilerde zarar ortalaması 0.07 olarak belirlenirken, tuzlu suya maruz kalan bitkilerde bu değer 0.34'e kadar yükselmiştir. $\text{A} \times \text{NaCl}$ faktörü ele alındığında, en yüksek zarara $110 \text{ R} \times \text{NaCl}^+$ interaksyonu (0.58) ulaşmıştır. Bunun aksine $1103 \text{ P} \times \text{NaCl}^-$ interaksyonunda zarar derecesi 0.00 olarak belirlenmiştir. $\text{A} \times \text{O}$ faktörü incelendiğinde hem VK+T+P hem T+P ortamında yetiştirilen 110 R bitkileri daha

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

yüksek zarar derecesine sahip olmuştur (Çizelge 3). NaCl × O etkisine bakıldığında VK+T+P ortamında yetişen bitkilerde zarar derecesi istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 2. Tuzlu ve tuzsuz su koşullarında vermikompostun 110 R ve 1103 P anacının kök gelişim özellikleri üzerine etkisi

Faktörler	İncelenen Özellikler				
	KU (cm)	KYA (g)	KKA (g)	KS (adet)	KTO
Anaç (A)					
110 R	17.29	2.53 b	0.51 b	5.81 b	0.91
1103 P	16.52	3.36 a	1.094 a	8.99 a	0.85
LSD _{%5}	Ö. D	0.65	0.16	0.98	Ö. D
NaCl					
NaCl ⁺	16.80	2.86	0.68 b	7.41	0.77 b
NaCl ⁻ (Kontrol)	17.00	3.04	0.93 a	7.39	1.00 a
LSD _{%5}	Ö. D	Ö. D	0.16	Ö. D	0.14
Ortam (O)					
T+P (Kontrol)	15.88	3.13	0.76	7.70	0.92
VK+T+P	17.93	2.77	0.85	7.10	0.84
LSD _{%5}	Ö. D	Ö. D	Ö. D	Ö. D	Ö. D
A x NaCl					
110 R x NaCl ⁻	17.28	2.77 ab	0.57 bc	6.00 b	1.00 a
110 R x NaCl ⁺	17.30	2.30 b	0.45 c	5.62 b	0.83 ab
1103 P x NaCl ⁻	16.73	3.31 a	1.29 a	8.79 a	1.00 a
1103 P x NaCl ⁺	16.30	3.42 a	0.90 b	9.20 a	0.71 b
LSD _{%5}	Ö. D	0.92	0.23	1.38	0.20
A x O					
110 R x (T+P)	16.61	3.14 a	0.54 c	6.63 b	0.92
110 R X (VK+T+P)	17.96	1.92 b	0.48 c	4.98 c	0.91
1103 P X (T+P)	15.15	3.11 a	0.97 b	8.77 a	0.93
1103 P X (VK+T+P)	17.89	3.62 a	1.22 a	9.21 a	0.78
LSD _{%5}	Ö. D	0.92	0.23	1.38	Ö. D
NaCl x O					
NaCl ⁻ X (T+P)	15.71	2.98	0.80 b	7.90	1.00 a
NaCl ⁻ X (VK+T+P)	18.30	3.09	1.05 a	6.89	1.00 a
NaCl ⁺ X (T+P)	16.05	3.28	0.71 b	7.51	0.85 ab
NaCl ⁺ X (VK+T+P)	17.55	2.44	0.64 b	7.31	0.69 b
LSD _{%5}	Ö. D	Ö. D	0.23	Ö. D	0.21
A x NaCl x O					
110 R x NaCl ⁻ x (T+P)	16.47	2.90 a	0.59 cd	6.83 bc	1.00 a
110 R x NaCl ⁻ x (VK+T+P)	18.09	2.63	0.55 d	5.17 cd	1.00 a
110 R x NaCl ⁺ x (T+P)	16.76	3.39 a	0.50 d	6.44 cd	0.85 ab
110 R x NaCl ⁺ x (VK+T+P)	17.84	1.20 b	0.41 d	4.80 d	0.82 ab
1103 P x NaCl ⁻ x (T+P)	14.95	3.16 a	1.02 b	8.97 a	1.00 a
1103 P x NaCl ⁻ x (VK+T+P)	18.51	3.55 a	1.56 a	8.60 ab	1.00 a
1103 P x NaCl ⁺ x (T+P)	15.34	3.06 a	0.92 b	8.57 ab	0.86 ab
1103 P x NaCl ⁺ x (VK+T+P)	17.27	3.68 a	0.88 bc	9.82 a	0.56 b
LSD _{%5}	Ö. D	1.30	0.32	1.96	0.29

T: Torf, P: Perlit, VK: Vermikompost, NaCl⁻: Tuzsuz su (kontrol), NaCl⁺: Tuzlu su, KU: Kök uzunluğu, KYA: Kök yaş ağırlığı, KKA: Kök kuru ağırlığı, KS: Kök sayısı, KTO: Kök tolerans oranı

Tüm faktörler incelendiğinde 110 R × NaCl⁺ × (T+P) interaksiyonundaki bitkilerde zarar derecesinin en yüksek (0.78) olduğu belirlenmiştir. Bitkilerdeki iyon akışı incelendiğinde anaç, tuzluluk ve ortam faktörleri bakımından görülen farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Buna ek olarak 1103 P

anacı, 110 R anacına göre daha yüksek iyon akışına sahip olmuştur. Ayrıca tuzlu suya maruz kalan bitkilerde iyon akışı değerlerinde de artış belirlenmiştir. A × NaCl interaksiyonu bakımından en düşük iyon akışına, tuzsuz su koşullarında yetiştirilen 1103 P anacı çelikleri (%67.71) sahip olmuştur. NaCl × O

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

interaksiyonu açısından VK+T+P ortamı ile NaCl⁻ ve NaCl⁺ koşullarında yetiştirilen bitkilerde iyon akışı daha yüksek bulunmuştur. Diğer interaksiyonlarla kıyaslandığında 110 R × NaCl⁻ × (T+P) uygulamasında iyon akışı en düşük düzeyde belirlenmiştir (Çizelge 3). Hücre zarı zararlanması bakımından anaçlar arasındaki elde edilen farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuş olup, 110 R anacı ortalama %29.33'lük hücre zarı zararlanma değerine sahipken, 1103 P anacındaki zarar oranı %22.16 olarak tespit edilmiştir. Ortamın tuzlu su ile sulanmasıyla hücre zarı zararlanma oranında ciddi oranda artış belirlenmiştir. Bu özellik açısından bitki yetiştirme ortamları arasındaki farklılık ise önemli bulunmuştur. T+P ortamında yetiştirilen bitkilerde görülen zararlanma

ortalama %33.50 değerinde iken, VK+T+P ortamındaki bitkilerde bu oran %18.00 değerine kadar düşüş göstermiştir. A × O interaksiyonu bakımından elde edilen farklılık önemli bulunurken hücre zarı zararlanma oranı açısından en düşük değer VK+T+P ortamında yetiştirilen 110 R anacında (%17.00) elde edilmiştir. En yüksek zararlanma değeri ise T+P ortamında yetiştirilen 110 R anacından (%41.66) elde edilmiştir. A × NaCl⁻ × O faktörleri bakımından en yüksek hücre zararlanması ise %83.33 oranı ile 110 R × NaCl⁺ × (T+P) interaksiyonunda tespit edilmiştir 1103 P anacında en yüksek zarar değeri 1103 P × NaCl⁺ × (T+P) kombinasyonunda (%50.66) belirlenmiştir.

Çizelge 3. Tuzlu ve tuzsuz su koşullarında vermikompostun 110 R ve 1103 P anacının bazı fizyolojik parametreleri üzerine etkisi

Faktörler	İncelenen Özellikler				
	KI (SPAD)	YOSK (%)	ZD (0-3)	İA (%)	HZZO (%)
Anaç (A)					
110 R	24.86	89.39	0.36 a	80.04	29.33 a
1103 P	25.28	86.38	0.05 b	91.59	22.16 b
LSD _{%5}	Ö. D	Ö. D	0.08	Ö. D	5.50
NaCl					
NaCl ⁺	25.09	88.09	0.34 a	91.64	51.50 a
NaCl ⁻ (Kontrol)	25.05	87.69	0.07 b	79.99	0.010 b
LSD _{%5}	Ö. D	Ö. D	0.081	Ö. D	5.50
Ortam (O)					
T+P (Kontrol)	22.71 b	86.49	0.20	78.70	33.50 a
VK+T+P	27.44 a	89.28	0.21	92.94	18.00 b
LSD _{%5}	0.99	Ö. D	Ö. D	Ö. D	5.53
A x NaCl					
110 R x NaCl ⁻	25.42 ab	88.89	0.15 b	92.77 a	0.000 c
110 R x NaCl ⁺	24.30 b	89.90	0.58 a	92.36 a	58.66 a
1103 P x NaCl ⁻	24.69 ab	86.48	0.00 c	67.71 b	0.000 c
1103 P x NaCl ⁺	25.88 a	86.28	0.1 bc	90.92 a	44.33 b
LSD _{%5}	1.41	Ö. D	0.11	20.55	7.82
A x O					
110 R x (T+P)	21.99 c	87.90 ab	0.33 a	67.97 b	41.66 a
110 R X (VK+T+P)	27.73 a	90.88 a	0.39 a	92.11 a	17.00 c
1103 P X (T+P)	23.43 b	85.08 b	0.07 b	89.42 a	25.33 b
1103 P X (VK+T+P)	27.14 a	87.68 ab	0.03 b	93.77 a	19.00 bc
LSD _{%5}	1.41	5.10	0.11	20.55	7.82
NaCl x O					
NaCl ⁻ X (T+P)	22.07 b	86.19	0.15 b	68.15 b	0.000 b
NaCl ⁻ X (VK+T+P)	28.04 a	89.18	0.00 c	91.47 a	0.000 b
NaCl ⁺ X (T+P)	23.35 b	86.80	0.42 a	88.89 ab	67.00 a
NaCl ⁺ X (VK+T+P)	26.83 a	89.38	0.26 b	94.40 a	36.00 b
LSD _{%5}	1.41	Ö. D	0.11	20.55	7.83
A x NaCl x O					
110 R x NaCl ⁻ x (T+P)	21.63 e	88.19 ab	0.3 bc	45.26 b	0.000 d
110 R x NaCl ⁻ x (VK+T+P)	29.21 a	89.59 ab	0.00 d	90.17	0.000 d

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

110 R x NaCl ⁺ x (T+P)	22.35 e	87.62 ab	0.78 a	90.68 a	83.33 a
110 R x NaCl ⁺ x (VK+T+P)	26.25 bc	92.18 a	0.37 b	94.05 a	34.00 c
1103 P x NaCl ⁻ x (T+P)	22.51 de	84.19 b	0.00 d	91.75 a	0.000 d
1103 P x NaCl ⁻ x (VK+T+P)	26.86 b	88.78 ab	0.00 d	92.78 a	0.000 d
1103 P x NaCl ⁺ x (T+P)	24.35 cd	86.59 ab	0.14 cd	87.09 a	50.66 b
1103 P x NaCl ⁺ x (VK+T+P)	27.42 ab	86.59 ab	0.07 d	94.76 a	38.00 c
LSD% ₅	1.99	7.21	0.16	29.06	11.06

T: Torf, P: Perlit, VK: Vermikompost, NaCl⁻: Tuzsuz su (kontrol), NaCl⁺: Tuzlu su, Kİ: Klorofil içeriği, YOSK: Yaprak oransal su kapsamı, ZD: Zarar derecesi, İA: İyon akışı, HZZO: Hücre zarı zararlanma oranı

Tartışma

Bu araştırmadan elde edilen tuzluluğun asma gelişimine olan olumsuz etkisi farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Upreti ve Murti, 2010; Salem ve ark., 2011; Kök, 2012; Karimi ve Zadeh, 2013). Vermikompost, solucanlar ve mikroorganizmalar arasındaki etkileşim yoluyla organik maddelerin biyolojik olarak parçalanmasıyla oluşmaktadır (Atiyeh et al., 2001). Yüksek gözenekliliğe, havalandırmaya, drenaja, su tutma kapasitesine ve mikrobiyal aktiviteye sahip olan vermikompost iyi bir toprak düzenleyicisi olarak bilinmektedir (Mahmud ve ark., 2019). Solucan gübresi uygulamasının stres koşulu olmaksızın bahçe bitkileri türleri içinde yer alan domates (Goswami ve ark., 2017), biber (Castellanos ve ark., 2017), çilek (Singh et al., 2008; Rajbir et al., 2010; Čabilovski ve ark., 2023) muz (Athani ve Hulamani, 2000), ananas (Mahmud ve ark., 2019) ve daha pek çok bitki türünün büyümesi üzerinde olumlu etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu araştırmada tuz stresi koşullarında VK'nın ortam içinde kullanımıyla sürgün gelişim parametrelerinden yaprak sayısı, yaprak alanı ve boğum sayısı değerlerinin önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir. Buna ek olarak T+P ortamına göre VK eklenmiş ortamda yaprak oransal su içeriği belirli düzeyde artış göstermiştir. Tuz stresi koşullarında solucan gübresinin etkisine yönelik meyve türlerinden yalnızca nar türüne ait çalışmaya rastlanılmıştır. Bidabadi ve ark. (2017), yapraktan nar çöğürlerinde vermikompost uygulamasıyla yaprak Na birikiminin azaltılarak tuz stresinin olumsuz etkisinin hafifletildiği ve vermikompost uygulamasına bağlı büyüme parametrelerinde olumlu etkilerin belirlendiği bildirmişlerdir. Tuz stresi koşullarında vermikompost kullanımıyla bitki gelişimi üzerine bu çalışma sonuçlarına

benzer olumlu etkiler fasulye (Beykkhormizi ve ark., 2016), domates (Benazzouk ve ark., 2018) ve marul (Kıran, 2019) gibi sebze türlerinde de elde edilmiştir.

Sonuç

Bu araştırmayla farklı Amerikan asma anaçlarının, T + P ve VK +T + P ortamlarında, tuzlu ve tuzsuz koşullardaki bitki gelişim parametreleri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; tuz stresinde solucan gübresi kullanımının bitki gelişimi açısından faydalı olabileceği belirlenmiştir. Strese giren bitkilerde kontrole kıyasla gelişim ve fizyolojik parametreler açısından olumsuz etkiler tespit edilmiştir. Tuz stresine tabii tutulan bu iki anaçta özellikle kök kuru ağırlığı ve kök tolerans oranı değerleri önemli düzeyde azalma gösterirken zarar derecesi ve hücre zarı zararlanma oranı değerlerinde artış saptanmıştır. 1103 P anacında 110 R anacına göre çoğu bitki gelişim parametreleri açısından daha üstün sonuçlar elde edilmiştir. 1103 P anacının 110 R anacına göre daha az zarar derecesine ve hücre zarı zararlanma oranına sahip olduğu da tespit edilmiştir. İnteraksiyon bulgularına göre de vermikompostun 1103 P anacında daha etkin olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara dayalı olarak 110R anacına kıyasla 1103P anacının tuz stresine daha dayanıklı olduğu ve tuzlu şartlarda vermikompost kullanımıyla bitkilerin tuz stresinden daha az olumsuz etkilenebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Teşekkür

Bu makale Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün A2352 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

Kaynaklar

- Athani, S.I., Hulamani, N.C. (2000) Effect of vermicompost on fruit yield and quality of banana cv. Rajapuri (Musa AAB). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*. 13(4): 942-946.
- Atiyeh, R. M., N. Arancon, Edwards, C.A., Metzger, J. D. (2000) Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. *Bioresource Technology* 75(3):175–80. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00064-X)
- Atiyeh, R.M., Edwards, C.A., Subler, S., Metzger, J. (2001) Pig manure as a component of a horticultural bedding plant medium: effect on physiochemical properties and plant growth. *Bioresource Technology*. 78: 11-20.
- Ayyobi, H., Olfati, J. A., Peyvast, G.A. (2014) The effects of cow manure vermicompost and municipal solid waste compost on peppermint (*Mentha piperita* L.) in torbat-e-jam and Rasht regions of Iran. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 3(4):147–53. <https://doi.org/10.1007/s40093-014-0077-8>.
- Benazzouk, S., Lutts, S., Djazouli, Z.E. (2018) Alleviation of salinity stress by Vermicompost extract in *Solanum lycopersicum* L. by mobilizing salt tolerance mechanisms. *AgroBiologia*. 8:1136–1144.
- Beykhhormizi, A., Abrishamchi, P., Ganjeali, A., Parsa, M. (2016) Department of Department Effect of vermicompost on some morphological, physiological and biochemical traits of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress. *Journal of Plant Nutrition*. 39(6):883-893.
- Bidabadi, S.S., Dehghanipoodeh, S., Glenn, C. W. (2017) Vermicompost leachate reduces some negative effects of salt stress in pomegranate. *Int J Recycl Org Waste Agricult*. 6:255–263. DOI 10.1007/s40093-017-0173-7.
- Bilir Ekbiç, H. (2017) Effects of different salicylic acid doses on salt tolerance of American vine rootstocks. *Bangladesh Journal of Botany*. 46(2):639-645.
- Bilir Ekbiç, H., Ozcan, N., Erdem, H. (2020) Impacts of salicylic acid treatments on salt resistance of some American grapevine rootstocks. *Fresenius Environmental Bulletin*. 20(2): 685-692.
- Čabilovski, R., Manojlović M.S., Popović, B. Radojčin, M.T., Magazin, N., Petković, K., Kovačević, D., Lakićević, M.D. (2023) Vermicompost and Vermicompost Leachate Application in Strawberry Production: Impact on Yield and Fruit Quality. *Horticulturae*. 9(3):337 <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030337>
- Castellanos, J.Z.; Cano-Ríos, P.; García-Carrillo, E.M.; Olalde-Portugal, V.; Preciado-Rangel, P.; Ríos-Plaza, J.L.; García-Hernández, J.L.(2017) Hot pepper (*Capsicum annuum* L.) growth, fruit yield, and quality using organic sources of nutrients. *Compost Sci. Util*. 25: 70–77.
- Dardeniz, A., Muftuoglu, N. M., Altay, H. (2006). Determination of salt tolerance of some American grape rootstocks. *Bangladesh Journal of Botany*, 35(2): 143-150.
- De Loryn, L.C., Petrie, P.R., Hasted, A.M., Johnson, T.E., Collins, C., Bastian, S.E.P. (2014) Evaluation of Sensory Thresholds and Perception of Sodium Chloride in Grape Juice and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1:124–133. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13088>
- Dlugokecka, E., Kacperska-Palacz, A. (1978) Re-Examination of electrical conductivity method for estimation of drought injuries. *Biologia Plantarum*. 20(4):262-267.
- Eyüpoğlu, F. (1998) Turkey's land verimiculite. *Soil-Fertilizer Research Institute Enst Yay Genel Yayın*220.
- Ezzat, A.S., Badway, A.S., Abdelkader, A.E. (2019) Sequenced vermicompost, glycine betaine, proline treatments elevate salinity tolerance in potatoes. *Middle East Journal of Agriculture Research*. 8:126–138.
- Fan, S., Blake, T.J. (1994) Abscisic acid induced electrolyte leakage in woody species with contrasting ecological requirements.

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

- Physiologia Plantarum*. 90(2):414-419. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb00407.x>
- Golla B. (2021) Agricultural production system in arid and semi-arid regions. *Journal of Agriculture and Food Technology*. 7(2):234–244. <https://doi.org/10.17352/2455-15X.000113>
- Goswami, L., Nath, A., Sutradhar, S., Bhattacharya, S.S., Kalamdhad, A., Vellingiri, K., Kim, K.H. (2017) Application of drum compost and vermicompost to improve soil health, growth, and yield parameters for tomato and cabbage plants. *J. Environ. Manag.* 200: 243–252.
- Karimi, H., Yusef-Zadeh, H. (2013) The effect of salinity level on the morphological and physiological traits of two grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *International Journal of Agronomy and Plant Production*. 4(5):1108-1117.
- Kıran, S. (2019) Alleviation of Adverse Effects of Salt Stress on Lettuce (*Lactuca Sativa* Var. Crispa) By Application of Vermicompost. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 18(5): 153–160.
- Kök, D. (2012) Farklı Salisilik Asit Dozlarının Asma Anaçlarının Tuzluluğa Dayanımı Üzerine Etkileri. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 9(2): 32-40.
- Lordan, J., Pascual, M., Fonseca, F., Villar, J. M., Rufat, J. (2013) Use of rice husk to enhance peach tree performance in soil switch limiting physical properties. *Soil and Tillage Research*. 129:19–22. <https://doi.org/10.1016/j.still.2013.01.002>
- Mahmud, M., Ramasamy, S., Othman, R., Abdullah, R., Syafawati Yaacob, J. (2019) Effect of Vermicompost Application on Bioactive Properties and Antioxidant Potential of MD2 Pineapple Fruits. *Agronomy*. 9(2): 97; <https://doi.org/10.3390/agronomy9020097>.
- Martinez Barroso, M. C., Alvarez, C.E. (1997) Toxicity symptoms and tolerance of strawberry to salinity in the irrigation water. *Scientia Horticulturae*. 71(3-4):177-188.
- Müftüoğlu, N. M., Dardeniz, A., Sungur, A., Altay, H. (2006). Bazı sofralık üzüm çeşitlerinin tuza toleranslarının belirlenmesi. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 20 (40): 37-42.
- Neja R.A., Ayers, R.S., Kasimatis, A.N. (1978) Salinity appraisal of soil and water for successful production of grapes. Leaflet 21056, Division of Agricultural Sciences, University of California, Berkely, USA.
- Özden, M., Demirel, U., Kahraman, A. (2009) Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Scientia Horticulturae*. 119(2):163-168. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.031>.
- Rajbir, S., Sharma, R.R., Singh, D.B. (2010) Effect of vermicompost on plant growth, fruit yield and quality of strawberries in irrigated arid region of northern plains. *Indian Journal of Horticulture*. 67(3): 318- 321.
- Rao, K., Raghavendra, A., Reddy, K. (2006) Physiology and molecular biology of stress tolerance. Springer. Dordrecht.
- Salem, A.T., Abdel-Aal, Y.A., Abdel-Mohsen, M.A., Yasin, W.H. (2011) Tolerance of Flame Seedless grapes on own root and grafted to irrigation with saline solutions. *Journal of Horticultural Science and Ornamental Plants*. 3(3): 207-219.
- Shahbaz, M., Ashraf, M. (2013) Improving Salinity Tolerance in Cereals. *Critical Reviews in Plant Sciences* 237-249. <https://doi.org/10.1080/07352689.2013.758544>
- Singh, R., Sharma, R.R., Kumar, S., Gupta, R.K., Patil, R.T. (2008) Vermicompost substitution influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Bioresource Technology* 99(17): 8507-8511. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.034>.

Farklı Asma Anaçlarının Tuz Stresine Dayanımları Üzerine Solucan Gübresinin Etkisi

- Unagwu, B. O., Asadu C. A., Ezeaku P. I. (2013) Residual effects of organic and npk fertilizers performance at different soil pH levels. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 5(5):47–53. <https://doi.org/10.9790/2380-0554753>.
- Upreti, K.K., Murti, G.S.R. (2010) Response of grape rootstocks to salinity: changes in root growth, polyamines and abscisic acid. *Biologia Plantarum*.54(4):730-734.
- Walker, R.R., Blackmore D.H., Clingeffer, P.R., Correll, R.L. (2002) Rootstock effects on salt tolerance of irrigated field-grow grapevines (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana.) 1. Yield and vigour interrelationships. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 8(1):3-14. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2002.tb00206.x>
- Wang, Z., Tan, W., Yang, D., Zhang, K., Zhao, L., Xie, Z., Zhang, D. (2021) Mitigation of soil salinization and alkalization by bacterium-induced inhibition of evaporation and salt crystallization. *Science of the Total Environment*. 755:142511. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142511>.
- Yamaguchi, T., Blumwald, E. (2005) Developing salt tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sciences*. 10(12):615–620.
- Zhu, J.K. (2007) *Plant Salt Stress*; John Wiley & Sons, Ltd: Hoboken, NJ, USA. Erişim: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780470015902.a0001300.pub2>



Research Article

The Development of Green Houses in the Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

Burçak KAPUR^{1*}, Deniz SOLMAZ², Uğur KEKEÇ³, Müge ERKAN CAN¹

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the agricultural and structural condition of the greenhouses in the Mersin region of Akdeniz district as well as the structural and technical issues. A face-to-face survey conducted in the field to determine the agricultural information in greenhouse enterprises as well as the material information used in greenhouses in the research region. The products, greenhouse types and construction techniques were determined by the survey, measurement, observation and photography studies conducted in the region. Because of the region's climate and economic value of the crop, 95.2% of the producers who took part in the survey cultivate pepper. It was determined that all greenhouses in the region were plastic-covered greenhouses. Greenhouse materials are made of steel profile or steel pipe. Most of the greenhouses were found to be without projects and installed by local manufacturing craftsmen. Furthermore, it has been determined that the region's greenhouses have problems with heating, ventilation, and irrigation system design. It has been suggested that a crop-requirement-driven irrigation schedule in greenhouses can boost output while making cost-effective use of water resources. Additionally, the importance of mechanical ventilation and roof ventilation should be explained to producers. In order to ensure proper ventilation, the design should allocate a minimum of 15% of the floor surface in greenhouses up to three decares, and a minimum of 25% of the floor area in greenhouses larger than three decares.

Keywords: Greenhouse, structural problems, irrigation, greenhouse materials

Seraların Tarımsal ve Yapısal Yönden İncelenmesi ve Geliştirilmesi Üzerine Bir Araştırma: Mersin İli Örneği

ÖZ

Bu çalışma, Mersin ili Akdeniz ilçesindeki seraların tarımsal ve yapısal yönden mevcut durumu, yapısal ve teknik sorunlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Araştırma bölgesinde seracılık yapan işletmelerdeki tarımsal bilgiler ve seralarda kullanılan malzeme bilgileri sahada bire bir yapılan anket çalışmasıyla belirlenmiştir. Bölgede yapılan anket, ölçme gözlem ve fotoğraflama çalışmalarıyla alandaki yetiştirilen ürünler, sera tipleri ve yapım teknikleri belirlenmiştir. Ankete katılan üreticilerin %95.2'si bölgenin iklim şartları ve ekonomik değeri nedeniyle biber yetiştiriciliği yapmaktadır. Seraların tamamının plastik örtülü seralardır. Sera malzemeleri çelik profil veya çelik borundan yapılmıştır. Seraların tamamının projersiz olduğu ve çevredeki imalat yapan ustalar tarafından kuruldukları tespit edilmiştir. Bölgedeki seralarda havalandırma, ısıtma ve sulama planlaması sorunlarının olduğu belirlenmiştir. Üreticilere seralarda bitki ihtiyacına göre yapılacak yeterli bir sulama ile verim artışı sağlanabileceği gibi su kaynaklarının tasarruflu bir şekilde kullanılmasına da katkı sağlanabileceği önerisi yapılmıştır. Buna ek olarak, yeterli bir havalandırma için 3 dekara kadar olan seralarda mutlaka taban alanının en az % 15'i, 3 dekadardan daha büyük seralarda ise mutlaka taban alanının en az % 25'i kadar tepe havalandırması olacak şekilde projelendirilmesi ve kurulmasının buna göre yapılması önerilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sera, yapısal sorunlar, sulama, sera malzemesi

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-6131-4458, 0009-0000-3505-9430, 0000-0003-1321-9135, 0000-0002-0744-1496

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 04.04.2024

Kabul Tarihi: 30.04.2024

¹ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, 01330, Adana

² Tarımsal Kalkınma ve Kırsal Destekleme Kurumu, 33140, Mersin

³ Çukurova Üniversitesi, Yumurtalık Meslek Yüksek Okulu, Organik Tarım Bölümü, Adana

*E-posta: bkapur@cu.edu.tr

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

Introduction

Greenhouses are structures or construction parts that are covered with light-permeable materials, including fiberglass, plastic, or glass, and whose climatic conditions can be adjusted to create an ideal atmosphere for plant development. These are facilities designed to economically produce a wide range of crops, along with their seeds, seedlings, and tree saplings, all year round by fully or partially regulating, depending on the environmental conditions related to temperature, light, humidity, and air quality (MEGEP, 2007). In Türkiye, greenhouse agriculture has gained commercial importance with the beginning of the use of plastic in agriculture. The 1970s and 1980s showed a rise in greenhouse production in areas with favorable ecological conditions. A major portion of the area increase in the 1990s was also attributed to resource utilization and support fund incentives provided to greenhouse investments and expanding (Tuzel et al., 2020). Turkey is ranked second in Europe behind Spain, although it is ranked fourth globally in terms of greenhouse economy (Gürpınar and Aktürk, 2023). In Turkey, the distribution of greenhouse agricultural regions and the distribution of yearly average temperatures are nearly identical. The majority of Turkey's greenhouse area is located around the southern coast, where the climate is most ideal. The proliferation of greenhouses, particularly in coastal locations, has been made possible by the steel material's durability and the plastic's ease of use.

In Türkiye, Antalya leads overall in greenhouse production. The provinces of Mersin, Adana, and Muğla are the ones that come after this one. Approximately 90% of the nation's total greenhouse production is produced in these provinces with an overall greenhouse production in these four provinces is estimated to be 6.7 million tons (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2019; Gürpınar and Aktürk, 2023). In Mersin, which

has a significant share in greenhouse cultivation, this area is 196554.5 decares. While 57.8% of the covered areas are plastic and glass, the remaining 43.2% consists of low and high plastic tunnels (TUİK, 2018)

The greenhouse sector is constantly expanding in Türkiye and is becoming more attractive for investment day by day. However, there are certain structural and agricultural problems with greenhouse farming. These problems include improper greenhouse design, wrong material selection, unsuitable greenhouse type selection for the area, and incorrect plant selection for production. In light of these issues, greenhouses with adequate technical and agricultural infrastructure have been erected. There will be a variety of crop yield losses if the environmental regulations are ignored and the growing conditions in the greenhouse are not maintained. This can be accomplished by controlling agricultural practices like structural improvements of greenhouses, appropriate irrigation application, efficient fertilization, appropriate spraying, availability of mechanization, use of high-quality seeds, and so on. This will increase production and provide a greater income for the local producers.

Thus, this study examined at the agricultural and structural elements of greenhouses in the Adanalıoğlu region in the central Akdeniz district of Mersin province. The products grown agriculturally in the region, the growing conditions and the structural condition of the greenhouses were tried to be determined by a survey conducted to the producers. Fieldwork and producer interviews were used to identify the enterprises in the research region. Surveys, observations, measurements, and photos were used to give the producers the information they needed about the enterprises.

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

Materials and Methods

The basic data used in the study was gathered from a questionnaire that was given to small-scale greenhouse producers in the Akdeniz district of Mersin province, which are situated on the country's eastern Mediterranean coast (Figure 1). Due to the unique climate of the research region, which has a Mediterranean climate, intense greenhouse farming is practiced therein. In the region, it could be partially seen the continental climate from the coast towards

the Taurus Mountains. The fact that the Taurus Mountains extend in the east-west direction in Mersin prevents the cold air coming from the north. In this case, greenhouse cultivation contributes to the winter months in the region. Due to the characteristics of the Mediterranean climate, there are very few frosty days in the region, making greenhouse cultivation in the area even more convenient. The altitude of the region is 8 meters close to the seashore.

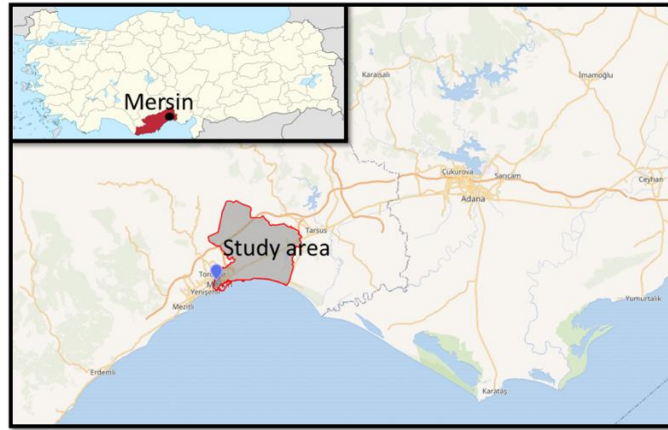


Figure 1. The area bordered in red is Mersin province and the working area Akdeniz district is shown by the gray part (TUBS, 2024)

The district's high tunnel was chosen as the most productive area in 2018, despite the fact that glass greenhouses and low tunnels were not used for production. Second place goes to Plastic Greenhouse, with an output of 13,000 decares. Pepper is the most grown product in the region

(Table 1), with a production of 97,500 tons in high tunnels on 15,000 decares and 70000 tons of pepper in plastic greenhouses on 10000 decares (Table 2) (TÜİK, 2018).

Table 1. High tunnel vegetable cultivation in Akdeniz district, Mersin province

Cultivated High Tunnel Vegetables	Decare	Tons
Pepper	15000	97500
Cucumber	6500	65000
Tomatoes	3500	42000
Aubergine	2000	12000

Table 2. Vegetable production in plastic greenhouses in Mersin province Akdeniz district

Vegetable Produced in Plastic Greenhouses	Decare	Tons
Pepper	10000	70000
Cucumber	1500	18000
Tomatoes	1500	18000

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

Face-to-face surveys were conducted with farmers located at the study area. The sample size of the research is "Based on Population Ratios" and was determined by the "Simple Random Probability Sampling" method (Malhotra 2004).

$$n = z^2 \times (p \times q) \times d^{-2}$$

n: Sample size

z: 1.64 (standard z value corresponding to 90% confidence level)

p: The proportion of the population that has a certain characteristic based on prior knowledge or prediction about the subject under study. (As a result of the literature study and the test survey, it was determined as 0.2).

q: (1-p) The proportion of the population that does not have the relevant feature

d: The accepted error tolerance level is $\pm 5\%$.

Accordingly, in the resulting framework list, the number of sample enterprises was calculated as 21 enterprises with a 90% confidence level and a 5% deviation from the average. After the pilot survey application, the surveys were finalized. Fieldwork and producer interviews were used to identify the enterprises in the research region. The necessary data about the enterprises were provided to the producers through surveys, observations, measurements and photographs. There are three distinct sections on the research survey form. The producers' demographic information (age, education level, employment status outside of agriculture, number of family members, etc.) is included in the first section. Questions regarding the enterprise's agricultural practices and problems are covered in the second section. Finally, questions about the structural conditions of the enterprises are covered in the third section. The analysis of the surveys is carried out statistically according to the percentage frequency values of the responses to the survey questions. Microsoft-Excel computer program was used to evaluate the data obtained from the study.

Results and Discussion

An Assessment of Selected Enterprises

In the research area, 21 enterprises were the subject of studies. While some producers own individual greenhouses on separate parcels, others own block greenhouses on a single parcel. In the research region, greenhouse installations are typically planned based on the producer's available parcel shape. All greenhouses evaluated in the study are constructed without project. The installation of the greenhouses was done by the construction foreman and producers themselves in the region. Producers who rent the property often produce in high tunnels, whereas businesses that own the land in the area typically produce in plastic greenhouses. The low installation cost of the high tunnel is the cause of this.

The majority of the producers who took part in the survey (42.9%) had only completed their elementary education, while the lowest percentage (9.5%) had completed their university degree. The percentage of people who completed secondary education was 19%, while the percentage of people who completed high school was 28.6%. In a related study using a survey, Tüzel et al. (2010) reported that 90% of the enterprise owners of the greenhouses in the villages and Serik district of Antalya are primary school graduates and that the greenhouses are small scale, family-run enterprises. So that, Because of variations in study areas and time periods, there have been shifts in educational levels in this location.

Among producers in enterprises, young farmers (those under 40) make up 42.9% of the age group; producers over 40 make up 57.1% of the group. The size of the greenhouse areas in the researched enterprises is that while the smallest greenhouse area is 3 decares, the largest greenhouse area is 25 decares (Table 3).

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

Table 3. Greenhouse areas of the enterprises in the research (decare)

Enterprise area (decar)	Number of enterprise	Percentage (%)
3	1	4.8
7	3	14.3
7.5	1	4.8
8	3	14.3
9	2	9.5
10	2	9.5
11	3	14.3
12	3	14.3
13	1	4.8
17	1	4.8
25	1	4.8

In the region, 19% of producers rent land, while 81% of farmers grow their crops in their own greenhouses.

Construction Materials for Greenhouses

Due to problems with these materials and advancements in technology, producers who formerly used wood and iron as carrier materials for greenhouses have opted to use steel profiles or galvanized iron. Steel construction material is

used in all greenhouses in the research area. Plastic greenhouses account for 90.5% of the enterprises, whereas high tunnels make for 9.5% (Table 4). In the surveyed enterprises, the spring roof and pipe system is most preferred with 52.4%. It is followed by the spring roof profile system with 38.1% and the steel cage system with 9.5%. High tunnels are mostly preferred by producers who rent land (Figure 2).

Table 4. Greenhouse types of the enterprises in the research

Greenhouse Types	Enterprises number	Percentage (%)
Plastic greenhouses	19	90.5
Others (High tunnels)	2	9.5
Spring roof and pipe system		
52.4%	Spring roof profile system	
38.1%		Steel cage system
		9.5%

All greenhouses examined do not have a static project. Greenhouses are mostly established according to the samples taken by the producer from the neighbouring environment. In this case, it leads to problems with greenhouse structures. As stated in a similar study by Baytorun (1995),

wood and plastic were widely used in our country until the mid-1980s, and manufacturers began to use steel pipe or steel profile systems as construction in the 1990s, but structural errors occurred in greenhouses built by people without technical knowledge.

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province



Figure 2. High tunnels and greenhouse with roof spring pipe system in the reseach area

Cover Material

In our country, as well as in others with extensive greenhouse farming, polyethylene (PE) plastic is the most popular covering material. The primary cause of this is the cost-effectiveness of plastic in comparison to alternative covering materials. Manufacturers prefer plastic covers containing UV, IR and antifog additives, which are more durable and have better light permeability.

Additive plastic cover material is used in all greenhouses in the research area. 47.6% of producers alter the cover material for longer than two years, compared to 52.4% who do so every two years (Table 5). It has been reported that while cover materials have grown less durable, their quality has declined recently. In this case, it increases the expenditure for cover material. Zabeltitz (1988) found similar outcomes in his investigation of the requirements of plastic

greenhouse producers for greenhouse construction. Furthermore, according to Baytorun et al. (1993), there were significant issues with the cover material selection despite the Mediterranean Region's coastal location having significant advancements in greenhouse agriculture. Normal PE, UV added PE, and UV+IR+Antifog added PE cover materials were employed as plastic covers in the greenhouse investigation. Regarding light, photosynthesis is how plants use sunlight to create organic matter in order to develop. An overabundance of light intensity or low light levels can interfere with photosynthesis in plants, which can impact crop quality, production, and color (Kumar et al., 2022), so that, its important to select the cover materials.

Table 5. The plastic material types and temporal using status

Plastic materials	Quantity of Enterprises	Percentage
Polyethylene UV (Yellow Plastic)	1	4.8
Polyethylene UV+IR+Antifog	20	95.2
Temporal using status		
2 years or less	11	52.4
2 years < more	10	47.6

Ventilation, Heating and Irrigation

In greenhouses, ventilation is used to lower the temperature and maintain a specific humidity level. Also, adequate ventilation is necessary to provide the CO₂ that plants need. Proper ventilation is necessary in greenhouses because

various diseases can arise in environments with inadequate ventilation. Though having the perfect climate in the greenhouse may be best for plant growth, it also encourages the spread of diseases and pests (Canadas et al., 2017).

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

In the research area, producers use the natural ventilation method. Opening the greenhouses' side walls, front facades, and greenhouse entrances allows for ventilation during extreme temperatures (Figure 3). Producers do not use mechanical ventilation (fan system) and roof ventilation methods at all. There is no infrastructure to provide this type of ventilation in the surveyed greenhouses. For this reason, sufficient ventilation is not provided in the greenhouses in the region. This situation is insufficient for a seaside area with high humidity. Therefore, for adequate ventilation, it must be designed to have at least 15% of the floor area in greenhouses up to 3 decares, and at least 25% of the floor area in greenhouses larger than 3 decares, and the installation must be done accordingly (Anonymous, 2016).

The efficiency of these systems was assessed in order to guarantee effective output in the

summer rather than the winter months in Coşkun and Filiz's (1997) study on the PED fan system, an active cooling system in greenhouses in the Mediterranean environment. The study's findings revealed that the internal temperature of the greenhouse dropped to an average of 25 °C when the fan, pad, and shade system were all used simultaneously and this temperature is sufficient for the plant's growth. Similar strategies ought to be applied in this situation to boost output in the field of work along with related areas. In a related study, Sevğican (1999) noted that roof ventilation systems in Turkish greenhouses are not operating at the optimal level and clarified that roof ventilation in greenhouses should be applied at a rate of 20% of the floor area in order to provide optimum ventilation. This value has been determined at 1-4% levels in greenhouses in Turkey.



Figure 3. Ventilation on the front and side parts of plastic greenhouses

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

Heating in accordance with standards for plant growth in greenhouses is required. If heating is not carried out under appropriate conditions, it causes loss of efficiency in production. Heating in greenhouses in the region is provided only for frost protection. On frosty days, heat balance is tried to be achieved by using a stove in the greenhouse. Another way to prevent frost damage to the plants is to use the mini sprinkler irrigation system that is installed on the greenhouse roofs to irrigate on frosty days, so the temperature raised on the roof. Producers are utilizing this technique in an effort to further reduce heating expenses. The value of heating for improved plant growth and production efficiency is often overlooked by producers. Unfortunately, adequate conditions for heating

the greenhouses in the research region are not suitable. Baytorun et al. (1994) determined the humidity, temperature and radiation data required for the development of plants in greenhouses. Accordingly, in greenhouses, the temperature must be at least above 0 °C in order to prevent plants from being damaged by frost. It has been stated that heating should be done in greenhouses when the average temperature is below 12 °C.

Producers choose the irrigation technique based on the region's land conditions, the variety of plant being cultivated, and any pest and disease problems. Artesian wells are utilized by all producers within the research area for irrigation (Figure 4).



Figure 4. Water supply, drip irrigation system and control unit in greenhouse

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

Each enterprise surveyed uses drip irrigation (Table 6). The drip irrigation method has been found to be the most effective as it involves less labor and allows for simultaneous application of the plant fertilizer that the system requires. Similar studies by Sevgican et al. (2000) examine the techniques for irrigating crops grown in greenhouses. They found that, given grower conditions, drip irrigation is currently the most popular technique because of its many benefits. However, producers in the region do not measure the amount of water applied. The producers' experience and the artesian well's pump power determine how much irrigation water is applied to the crops. This is seen as a major disadvantage of the region in terms of efficient irrigation. Producers irrigate the plant without planning the irrigation water need, irrigation interval and irrigation time. In addition, there is no adequate drainage system in

greenhouses which could cause salinity in time. In addition, this circumstance results in an inefficient and costly use of water resources. Additionally, yield loss results from incorrectly estimating a plant's water requirements could occur in the study area. Clogging in the pipes were cited by 28.6% of the growers as the cause of the irrigation method's trouble, while 71.4% reported no problem (Table 6). Çevik (1995) and Cemek and Demir (2004) conducted an evaluation of the irrigation problems in greenhouses by examining the relationships between soil, plant, and water. They found that excessive watering led to both chemical and physical alterations, particularly in soils with insufficient drainage systems. In this context, similar problems have become inevitable for producers in the region. It is envisaged to receive consultancy services on irrigation planning.

Table 6. Irrigation methods, problems encountered in irrigation methods and water resources of enterprises in the region

Irrigation Method	Quantity of Enterprises	Percentage
Drip irrigation	21	100
Sprinkler irrigation	0	0
Mini sprinkler	0	0
The Problems in Irrigation Method		
	Quantity of Enterprises	Percentage
Clogging in pipes	6	28.6
No problem	15	71.4
Water resources		
	Quantity of Enterprises	Percentage
Artesian well	21	100
DSI irrigation canal	0	0

Fertigation and Spraying

One of the key elements that increases productivity in greenhouse production is fertilizer and fertilization. Farmers in the area use a variety of fertilizers. Fertilizer is regarded as one of the most crucial components in agricultural production since Kızılaslan and Kızılaslan (2005) found in their study that fertilizer and fertilization are very significant for increasing productivity in agricultural production.

Enterprises in the research area generally use similar fertilization practices because they grow the same type of product. To enhance soil structure and improve productivity, all growers apply chemical and organic fertilizers. Producers use 61.9% animal manure as organic fertilizer, and 33.3% use both animal manure and compost fertilizer (Table 7). Turkey's agricultural soils were found to be deficient in organic matter, particularly nitrogen, according to the findings of Ertiftik's (1998) study. In addition to applying chemical fertilizers containing phosphate,

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

potassium, and nitrogen, producers also apply fertilizers containing 85.72% micro and macro elements.

Numerous diseases and pests arise in greenhouses since they are enclosed environments used for continuous production. In order to combat these diseases and pests and minimize crop loss, producers in the research area apply pesticides. According to Tudi et. al. (2021), fruit production would have decreased by 78%, vegetable production by 54%, and cereal production by 32% if pesticides hadn't been used. Thus, over the world, pesticides are essential for lowering disease rates and raising crop yields. Fungal diseases are more

widespread in greenhouses in the area because of the close proximity of the study area to the seashore and the high humidity levels. Producers mostly combat against fungal diseases, and all enterprises use insecticides and nematicides in addition to fungicides in the region. Although 71.42% of farmers apply pesticides based on their observations of plants and the environment as well as their experience, 28.58% apply pesticides based on their experience as well as technical assistance (Table 7). According to Edward's (1986) research, pesticides are now considered essential due to their potent, fatal effect on pests and ability to produce higher-quality and more abundant fruit and vegetable yields.

Table 7. Organic fertilizer, chemical fertilizer and determining the pesticide use by enterprises in the region

Use of Organic Fertilizer	Quantity of Enterprises	Percentage (%)
Animal Manure	13	61.9
Compost Fertilizer	1	4.8
Animal Manure+Compost Fertilizer	7	33.3
Use of Chemical Fertilizer use		
	Applied enterprise quantity	Not Applied enterprise quantity
Nitrogen Fertilizers+Phosphorus Fertilizers+Potassium Fertilizers	21 (100%)	0 (0%)
Fertilizers containing Micro and Macro Elements	18 (85.72%)	3 (21.28%)
Determining the pesticide		
	Quantity of Enterprises	Percentage (%)
Based on Plant and Environmental Observations+Based on Experience	15	71.42
Based on Experience+ Taking Technical Support	6	28.58

Additional Difficulties

High production costs for inputs are among the primary issues facing producers in the region. The income of growers is significantly impacted by the high costs of pesticides, fertilizer, and diesel fuel. It has been stated that this situation is

not sustainable and a solution must be found, and that the insurance costs and labor costs of greenhouses are also high.

In addition to this circumstance, the survey investigation revealed that, according to 47.6% of the producers, the covering material was the

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

most frequent difficulty they had in their enterprises, with corrosion in the material coming in last at 4.8% (Table 8). Those who wish to build a new greenhouse have two

preferences for types of greenhouses: 4.8% want a glass greenhouse and 95.2% want a fully automated greenhouse.

Table 8. Problems Encountered by enterprises and tendency to establish desired greenhouses in the region

The most common problem in enterprises	Quantity of Enterprises	Percentage (%)
Cover material	10	47.6
Heating	2	9.5
Ventilation	8	38.1
Corosion of materials	1	4.8
Desired new greenhouse characteristics		
Glasshouse	1	4.8
Modern+full otomated greenhouse	20	95.2

Conclusions

In addition to providing a vital role in Turkey's agricultural production, greenhouse farming contributes significantly to the economy of Turkey. Production can be carried out throughout the year, allowing consumers to access fresh vegetables and fruits in every season. Compared to other agricultural approaches, greenhouse cultivation has a greater profitability rate when done appropriately and on-site. Under proper conditions, greenhouse farming on these lands can be a major sector that boosts productivity per unit area, lowers unemployment, and gives rural communities the appropriate amount of revenue from agricultural activities.

The goal should be to produce superior products in the research area's greenhouses while keeping in mind consumer needs and operating in settings that are safe for both human and environmental health. Producers need a significant income in order to produce under these conditions. However, the high initial costs of the producers cause the production to not be carried out under the desired conditions. Producers should receive support from relevant government agencies in order to lower these expenses.

Food safety and health should be the top priorities for greenhouse growers. In this context, controlling many factors in fully automated modern greenhouses ensures healthy and reliable products. The majority of the greenhouses in the study area are produced as modest family companies and are located remote from these technical advancements. The use of chemical pesticides and fertilizers in this type of production is primarily determined by the producers' experience, which creates challenges with the production of healthy and secure food. This should be avoided by having growers participate in extensive training programs run by the appropriate Ministry of Agriculture and Forestry entity.

In the research area, steel material is mostly used as greenhouse building material. Nonetheless, problems with the greenhouses arise from the fact that most of the greenhouses in the area are constructed by local workers either based on the producer's own design or another greenhouse sample collected from the surrounding area. By receiving technical support to resolve these structural problems. So that, Planning should be done for greenhouses with sufficient mechanical characteristics, high light transmittance, high ventilation efficiency, low heat consumption,

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

and a robust enough structure. The static structure, strength, and assembly of the greenhouse unit must be installed in accordance with Turkish Standards No. TS EN 13031-1, and all materials to be used in the construction of the greenhouse unit in the project must be at least TSE approved in order for these greenhouses to be approved for funding or financing from government agencies.

Light transmittance is very important in greenhouses. A correct cover material must be chosen to ensure sufficient solar radiation for the plants. In the selection of greenhouse cover materials; Wind resistance, light permeability, hail load resistance, heat permeability, ultraviolet permeability, condensation property, resistance to wear and insulation values should be taken into consideration.

Heating in greenhouses in the region is done only to protect them from frost, due to the Mediterranean climate. Because of this situation, plants are unable to complete their regular growth by spending the necessary amount of time at the right temperature, which has an adverse effect on productivity. Moreover, The plant rows along the greenhouse's outer walls may become damaged by the cold on chilly days due to the lower soil temperature outside the greenhouse. This situation can be prevented by installing an external drainage system of the greenhouse, which is not present in the greenhouses in the study area. Developing a form of greenhouse that will make the most use of renewable energy sources and solar energy with advanced technology is crucial in order to offer heat in greenhouses according to plant needs and at a cheap cost.

Producers primarily utilize natural ventilation. Greenhouse ventilation is insufficient as a result of this condition. It is essential to lower the temperature and maintain a specific humidity level in greenhouses while providing enough ventilation. Research ought to be done in this regard to inform producers about the significance of roof and mechanical ventilation. Plants can be effectively ventilated by using fans in conjunction with mechanical ventilation, particularly during hot weather.

Farmers in the study area irrigate plants based on their expertise rather than measuring the amount of water used. In order to properly irrigate, producers must schedule the time, interval, and amount of water needed by the plant. By adjusting irrigation to the plant's requirements, it is possible to maximize yield while conserving water.

Producers in the study area apply fertilizer and spray in accordance with their continuing knowledge of crop production. More insecticides and fertilizers are used by producers, particularly during the winter. Farmers will be able to apply more precisely and appropriately according to their knowledge with chemical fertilizers and pesticides, as well as soil and leaf analyses and the findings they acquire. In this sense, there should be more collaboration between farmers, district agricultural directorates, faculty of agriculture, and pesticide suppliers.

Therefore, production can be made at the appropriate quality and efficiency for further production by following these recommendations and taking the required measures.

References

- Anonymous (2016) Application Instructions on Minimum Conditions to be Required in Greenhouses. [https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Talimatlar/BUGEM/Seralarda%20Aranacak%20Asgari%20C5%9Earlilara%20Dair%20Uygulama%20Talimat%C4%B1%202016\(1\).pdf](https://www.tarimorman.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Talimatlar/BUGEM/Seralarda%20Aranacak%20Asgari%20C5%9Earlilara%20Dair%20Uygulama%20Talimat%C4%B1%202016(1).pdf), Erişim Tarihi:28.06.2019.
- Baytorun, N. (1995) Seralar. Ç.Ü. Ziraat Fak. Yayın No:110, Adana.
- Baytorun, N., Abak, K., Tokgöz, H., Altuntas, Ö. (1993) Effect of Different Plastic Cover Types on the Greenhouse Climate and Tomato Plant Development. 2nd. ISHS Symposium on Protected Cultivation of Solanaceain Mild Winter Climates. Adana-Turkey.
- Baytorun, N., Tokgöz, H., Üstün, S., Akyüz, A. (1994) Seralarda iklimlendirme

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

- Olanakları 3. Ulusal Soğutma ve İklimlendirme Kongresi Bildiri Kitabı 303-313 4-6 Mayıs Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Canadas, J., Antonio, J.S.M., Rodríguez, F., María Á.I. (2017) Improving automatic climate control with decision support techniques to minimize disease effects in greenhouse tomatoes, *Information Processing in Agriculture, Volume 4, Issue 1, Pages 50-63, ISSN 2214-3173,* <https://doi.org/10.1016/j.inpa.2016.12.002>.
- Cemek, B., Demir, Y. (2004) Testing of The Condensation Characteristics and Light Transmissions of Different Plastic Film Covering Materials. *Agricultural Structures and Irrigation Department, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey.*
- Çevik, B. (1995). Seralarda Sulama ve Drenaj Sorunları. *Topraksu Dergisi, 95/1, s. 23-24, Ankara.*
- Coşkun, M., Filiz, M. (1997) Sera içi Kliması Düzenleme ilkeleri ve Bu Konuda Gelişen Teknolojiler Üzerine Araştırmalar. 6. Ulusal Kültürteknik Kongresi, 5-8 Haziran Bursa
- Edward, C. A. (1986) *Agrochemicals an Environmental Pollutants Control of Pesticide Applications and Residues in Food A Guide and Directory Upplass, Swedish Press. 1-19.*
- Ertiftik, H. (1998) Tavuk Dışkısının Gübre Olarak Uygulanabilirliğini Artırma Üzerine Bir Araştırma, S.Ü. Fen Bilimleri Ens., Ziraat Fakültesi Toprak Anabilim Dalı, Konya. s. 112- 123.
- Gürpınar, K., Aktürk, A. (2023) Evaluation Of The Competitive Advantage Of Afyonkarahisar Province Sandikli District Geothermal Greenhouse Sector In The Light Of Executive Opinions. *Journal of Strategic Management Research. Vol.:6,(2): 163-184*
- Kizilaslan, N., Kizilaslan, H. (2005) Türkiye’de Kimyasal Gübre Kullanımı ve Tokat İli Artova İlçesinde Kimyasal Gübredeki Uygulamalar, *Gübreleme Çevre İlişkileri, Yayın No:129 ISBN:6-175, Tokat*
- Kumar, M., Haillot, D., Gibout, S. (2022) Survey and evaluation of solar technologies for agricultural greenhouse application, *Solar Energy, Volume 232, Pages 18-34, ISSN 0038-092X,* <https://doi.org/10.1016/j.solener.2021.12.033>.
- Malhotra, N.K, (2004) *Marketing research. (An Applied Orientation). Pearson Prentice. Fourth Edition. 173.*
- MEGEP (2007) *Mesleki Eğitim Ve Öğretim Sistemini Güçlendirme Projesi T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Bahçecilik, Sera Yapım Tekniği, 3-4, Ankara*
- Sevgican, A. (1999) *Örtü altı Sebzeçiliği. Cilt I. E.Ü. Ziraat Fakültesi YayınlarıNo:528. ISBN 975-483-384-2, İzmir*
- Sevgican, A., Tüzel, Y., Gül, A., Eltez, R.Z. (2000) *Türkiye’de Örtüaltı Yetiştiriciliği. V. Türkiye Ziraat Teknik Kongresi 2. Cilt, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, S. 679-707, 17-21 Ocak, Ankara.*
- Tarım ve Orman Bakanlığı (2019) <https://www.tarimorman.gov.tr/konular/bitkisel-uretim/tarla-ve-bahce-bitkileri/ortu-alti-kayit-sistemi>. Accessed: 12/9/2022.
- TUBS (2024) This vector image includes elements that have been taken or adapted from this file: [Turkey location map.svg](#) (by NordNordWest)., CC BY-SA 3.0,

The Development of Green Houses In The Southern Türkiye, with an Emphasis on Their Structural and Agricultural Features : The case of the Mersin province

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=15946937>).

- Tudi, M., Daniel, Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., Phung, D.T. (2021) Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. Int J Environ Res Public Health. 27;18(3):1112. doi: 10.3390/ijerph18031112.
- TÜİK (2018). Türkiye İstatistik Kurum Accessed:28.06.2019 <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- Tüzel, Y, Öztekin, G, Karaman, İ. (2010) Serik ilçesindeki Modern ve Geleneksel Sera işletmelerinin Üretici Özellikleri, Sera Yapısı ve Sebze Üretim Teknikleri Bakımından Karşılaştırılması. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 47 (3): 223-230.
- Tüzel, Y., Gül, A., Öztekin Gölgen B., Engindeniz, S., Boyacı, F., Duyar, H., Cebeci, E., Tunc, D. (2020) Türkiye’de örtüaltı yetiştiriciliği ve yeni gelişmeler. Türkiye Ziraat Mühendisliği IX. Teknik Kongresi, pp 725-750
- Zabeltitz, V. C. (1988) Greenhouse Desing for Warmer Climates. Plasticulture 80:39-50.



Research Article

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

Elif ÇAKIR^{1*}, Hatice BEKİROĞLU^{2,3}, Buse GÖKER⁴, Osman SAĞDIÇ²,

ABSTRACT

This study aims to investigate the impact of *Spirulina platensis* powder (SPL), from microalgae, on the technological, nutritional, and sensory properties of gluten-free functional biscuits. Biscuits were formulated with different rates of SPL powder (0%, 0.5%, 1%, and 5%) and evaluated for their physical, chemical, and sensory attributes. The inclusion of SPL significantly increased the protein, dietary fibre, phenolic, and antioxidant content of the biscuits. Biscuits with 5% SPL showed the highest levels of protein (8.01%), phenolics (27.8%), antioxidants (64.18%), and dietary fibre (2.1%). The addition of SPL also affected the hardness, brittleness and colour of the biscuits, resulting in darker and harder biscuits at higher SPL ratios. Sensory analysis revealed that biscuits with 0.5% SPL were most preferred, with higher SPL rates leading to a decrease in sensory scores.

Keywords: *Spirulina platensis*, sensory properties, antioxidant, gluten-free, biscuits

Glutensiz Fonksiyonel Bisküvi Üretiminde *Spirulina platensis*'in Tekstürel, Duyusal ve Bazı Fizikokimyasal Özellikler Üzerine Etkisi

ÖZ

Bu çalışma, mikroalglerden *Spirulina Platensis* tozunun (SPL) glutensiz fonksiyonel bisküvilerin teknolojik, besinsel ve duyusal özellikleri üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. Bisküviler farklı oranlarda SPL tozu (%0, %0,5, %1 ve %5) ile formüle edilmiş ve fiziksel, kimyasal ve duyusal özellikleri açısından değerlendirilmiştir. SPL'nin eklenmesi bisküvilerin protein, diyet lifi, fenolik ve antioksidan içeriğini önemli ölçüde arttırdı. %5 SPL'li bisküviler en yüksek düzeyde protein (%8,01), fenolikler (%27,8), antioksidanlar (%64,18) ve diyet lifi (%2,1) gösterdi. SPL ilavesi aynı zamanda bisküvilerin sertliğini, kırılgenliğini ve rengini de etkileyerek daha yüksek SPL oranlarında daha koyu ve daha sert bisküvilerin oluşmasına neden olmuştur. Duyusal analiz, %0,5 SPL'li bisküvilerin en çok tercih edildiğini, daha yüksek SPL oranlarının duyusal puanlarda düşüşe yol açtığını ortaya çıkardı.

Anahtar Kelimeler: *Spirulina platensis*, duyusal özellikler, antioksidan, glutensiz, bisküvi

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0003-4343-3706, 0000-0003-3328-1550, 0009-0009-3479-3321, 0000-0002-2063-1462

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 18.11.2023

Kabul Tarihi: 02.05.2024

¹ Department of Food Engineering, Engineering Faculty, Istanbul Aydın University, PO Box 38, 34295, Kucukcekmece, Istanbul, Turkey

² Department of Food Engineering, Chemical and Metallurgical Faculty, Yıldız Technical University, Esenler, Istanbul 34210, Turkey

³ Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Sırnak University, Sırnak, Turkey

⁴ Department of Food Technology, Applied Science, Istanbul Aydın University, PO Box 38, 34295, Kucukcekmece, Istanbul, Turkey

*E-posta: elifcakir@aydin.edu.tr

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

Introduction

Nowadays as a result of the current increase in diseases like celiac, obesity, diabetes and cancer, there is a higher trend toward functional foods beneficial to health in diets (Arab et al., 2019; Koh et al., 2020; Verbeke, 2005; Wirkijowska et al., 2018). Biscuits are snacks with high popularity, reaching a large consumer audience as a result of not going stale for long durations, being quick to eat, easily accessible and economic (Di Cairano et al., 2018; Sudha et al., 2007; Wesley et al., 2021). Biscuits sold in the market are generally based on cereals containing gluten (Rai et al., 2014; Wesley et al., 2021). However, as they may be formulated with high-value compounds and different flours, they have the possibility to be included in diets for different diseases by providing more choice and diversity. Individuals with celiac disease and other gluten-derived diseases (dermatitis herpetiformis, gluten ataxia and wheat allergy) (Di Cairano et al., 2018; Foschia et al., 2016) must eat a gluten-free diet for life. Most of these diets include products with high carbohydrate content, low protein content and nutritional deficiencies (Di Cairano et al., 2018; Fasano & Catassi, 2012; Fassano & Catassi, 2012; Jnawali et al., 2016; Leonard et al., 2017; Naqash et al., 2017). The use of cereals not containing gluten in bakery products causes problems with production and negative consumer approval (Di Cairano et al., 2018). Among gluten-free products, rice flour is easily digestible, involves low allergic reactions, is tasty according to consumers and can be produced from broken rice waste, which makes it indispensable as a resource in terms of raw material and sustainability (Kim & Shin, 2014). To overcome the nutritional deficiencies of functional compounds, the development of health and technological features appears to be an important tool (Abdo et al., 2021; Alongi et al., 2019; Pasqualone et al., 2015). In new research studies, they have referred to foods that have high nutritional values, as well as potential health benefits, and even reduce the risk of degenerative diseases by improving physical and emotional health, as superfoods (Gupta & Mishra, 2021). *Spirulina platensis* has been called a superfood (Jung et al., 2019) due to its

superior protein (essential amino acids), essential fat acids, vitamin and mineral content, as well as its versatile use properties, such as anti-viral, anti-bacterial, antioxidant, anti-diabetic, anti-cancer and anti-inflammatory effects (Ahsan et al., 2008; Jung et al., 2019; Marles et al., 2011; Menegotto et al., 2019). Additionally, *Spirulina platensis* has been recognized as a nutritious food by the United Nations World Food Conference (Jung et al., 2019). *Spirulina platensis* contains many natural bioactive compounds with high value and antioxidant capacity and has been the target of studies on the production of new foods and functional food components (Batista et al., 2017; Batista et al., 2012; Gouveia et al., 2007; Singh et al., 2015). In recent years, microalgae have been applied as an additive in many vegan or gluten-free products such as biscuits, pasta, sauces and jelly desserts. It has been stated that in addition to increasing the nutritional properties of the food it is added to, it makes positive contributions to the textural, colour and sensory properties (Fradique et al., 2010; Liber et al., 2020; Ramírez-Rodrigues et al., 2021; Thirumdas et al., 2018). Additionally, microalgae have strong survival ability against negative conditions in nature and are natural economic resources (Chen et al., 2022) that can be produced with high yield (Chen et al., 2022; Lévasseur et al., 2020). This study, aimed to provide gluten-free food consumers with alternative biscuits with improved functional, nutritional and quality properties from rice flour enriched with *Spirulina platensis* powder (SPL), which has high nutritional value. The effect of commercial *Spirulina platensis* powder added to rice flour at different rates (0%, 0.5%, 1% and 5%) on the technological, nutritional and sensory properties of biscuits will be investigated. The effects of SPL addition on protein, dietary fibre, phenolics, antioxidants, hardness, brittleness and colour were statistically analyzed.

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

Material and Method

Material

Rice flour (Sade Organik Ürünler San. Ve Tic. A.Ş., İstanbul), butter (Pervin, Sektör Endüstrisi Kurumu A.Ş, Bursa), L-size eggs (Bili bili, Verim Gıda Ürünleri San. Ve Tic. A.Ş, Bursa), baking powder (Destan, Sena Muhtelif Ürün used for production of the biscuits. During production, a dough kneading machine (Öztiryakiler Gurmeaid), and an oven (Svabe Dahlen, Sweden) were used.

Experimental Design

Biscuit dough was made by adapting the method of Rahman et al. (2020). Biscuits were produced, with one set of biscuits having no supplementation (0% control sample series), while the other sets had 0.5%, 1% and 5% *Spirulina platensis* powder (SPL). It is made by replacing 100 g of rice flour with 0.5%, 1% and 5% SPL in biscuit production. It consists of 40 g of margarine, 36 g of sugar, 2 g of baking powder, 2 g of cinnamon, 10 mL of milk and 10 g of egg. Depending on the *Spirulina platensis* powder ratio, biscuits containing SPLC 100% rice flour, 0% *Spirulina platensis*, SPL1 0.5% *Spirulina platensis*, SPL2 1% *Spirulina platensis*, SPL3 5% *Spirulina platensis* were produced as a substitute for rice flour. The dough was shaped with the aid of a cookie cutter and then baked at an appropriate temperature and duration (165±5°C 17 min) with the aid of an

Paketleme Gıda San ve Tic. Ltd. Şti., İstanbul), cinnamon (Destan, Seğmen Kardeşler Gıda Üretim ve Ambalaj Sanayi A.Ş., Ankara), milk (Dost, Aynes Gıda, Denizli), powdered sugar, and *Spirulina* (Aktarix) were

oven (Svabe Dahlen, Sweden). For biscuit production, the most appropriate sugar, rice flour, cinnamon, *Spirulina platensis*, baking powder, egg and butter proportions were calculated and used.

Biscuit Production

Rice flour, *spirulina* powder and baking powder were taken into a mixing bowl (Kitchen Aid, UK), then milk, egg, sugar and cinnamon were added and mixed first at speed 1 for approximately 200 seconds, then at speed 2 for 50 seconds to obtain the dough. The resulting dough was rested for approximately 5 minutes. The rested biscuit dough was placed on the marble counter and the rolling pin was opened to 4 mm. The rolled-out dough was made round using a 60 mm diameter mould. Baked in the oven (Svabe Dahlen, Sweden) at 170±5 °C for 17 min. The baked biscuits were cooled for about 2 hours and packed in polypropylene bags. Sensory analysis was performed immediately after cooling.

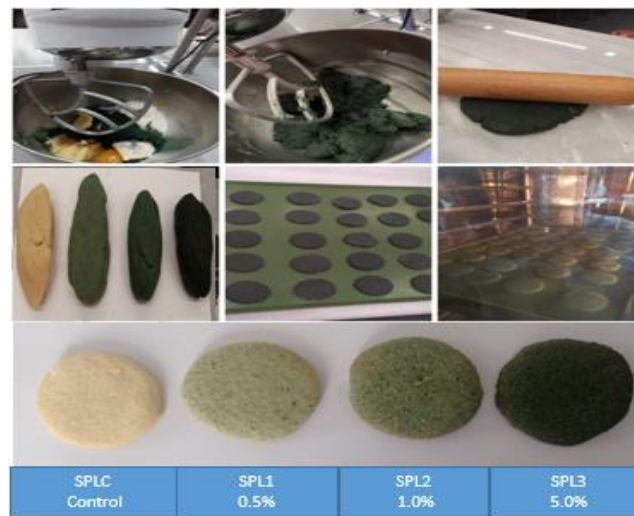


Figure 1. Control biscuit and biscuit samples with 0.5%, 1% and 5% (w/w) *Spirulina platensis*

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

Physical Analyses

The thickness of the gluten-free biscuit samples was measured with a digital calliper (0.001 mm Mitutoyo, Tokyo, Japan) according to the AACC Standard Method No: 10-54.01 principle, while the diameter was measured with a ruler. After measuring the diameter and thickness values (mm) of the biscuit samples, the spread rate of the biscuits was found by dividing the diameter by the thickness. The results for diameter, thickness and spread ratio were calculated by taking the average of 5 measurements (Committee, 2000).

Chemical Analyses

Humidity analysis of the biscuits was completed according to the method (Committee, 2000). The moisture analyzer (AND MX-50, Japan) was operated by selecting the 105 °C for 25 min. method. At the end of the duration, the % humidity result on the device was recorded. Ash analysis was completed according to AACC Method No: 08.01 (Committee, 2000). Ash amounts of biscuit samples were given as %ash. Protein amount detection was performed according to the Kjeldahl AACC Method No: 46-11A (AACC, 2000). After completing incineration, the Kjeldahl balloons were left to cool. The distillation process was completed for 10 min. in an Erlenmeyer flask with 3% boric acid and 33% NaOH solution. At the end of distillation, the solution in the Erlenmeyer flask was titrated with a burette filled with 0.1 N HCl solution. The results were inserted in the % raw protein formula to identify the protein proportion in samples. The nitrogen factor was calculated using 5.70.

Fat Analyses

The oil content analyses of the biscuit samples were performed using a Soxhlet extraction system (Extraction unit, E-816, Buchi, Flawil, Switzerland) in which hexane was used as a solvent. The oil content of the biscuit samples was expressed as % fat using the following equation.

$$\text{Fat (\%)} = (m_2 - m_1) * 100 / m_2$$

m1: Weight of erlenmeyer flask

m2: Weight of the erlenmeyer flask +oil

m: Weight of samples

Extraction of Biscuit Samples

Biscuit samples were ground thoroughly with an electric grinder. Powdered biscuit samples were mixed with methanol solution (70%) (weight: volume 1:10) and homogenized by ultraturax for 5 min. Bioactive components of the samples were extracted by keeping them at room temperature and in the dark for 2 hours and centrifuged at 6000 rpm for 10 min. The supernatant was removed and stored at +4°C for analysis (Kaur & Kaur, 2018).

Determination of Total Phenolic Content (TPC)

After diluting 0.5 mL of sample extract with distilled water in appropriate proportions, it was mixed with 2.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent (0.2N) and 2 mL of Na₂CO (7%) and kept at 25 °C in the dark for 30 min. The TPC of the samples was calculated by reading the absorbances with a spectrophotometer (Shimadzu UV 1800; Kyoto, Japan) set at a wavelength of 760 nm. TPC results are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) per 100 grams of sample with a linear standard curve range ($r^2 = 0.994$) (Singleton et al., 1999).

Antioxidant activity assays

DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl)

Methods

0.1 mL of sample was mixed with 4.9 mL of DPPH solution (0.1 μM in methanol) and kept in the dark at 27°C for 20 min. Its absorbance was then determined using a UV spectrophotometer at a wavelength of 517 nm (Brand-Williams et al., 1995). DPPH calculation was made according to the following formula:

$$DPPH \text{ Radical Inhibition (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100$$

A_c: Absorbance of control, A_s: Absorbance of sample

FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) Assay

For the study FRAP reagent, 300 mM acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) and 20 mM FeCl₃.6H₂O and C, called solutions A, B, were prepared respectively. These solutions were then mixed in a ratio of A:B:C to 10:1:1. After 100 μL sample

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

extract, 900 μ L distilled water and 2 mL working FRAP reagent were thoroughly mixed and kept in the dark for 30 min., the absorbances were read at 593 nm wavelength. FRAP results of the extracts were expressed as mg Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/100g sample ($r^2 = 0.992$) (Benzie & Strain, 1996).

Dietary Fibre

Total dietary fibre (TDF) was determined according to AOAC Method 985.29 (Dodevska et al., 2013) on duplicate samples of dried and defatted (if fat content >10%) material. Samples were fired at 100 °C; incubated with protease (to solubilize and depolymerize proteins) and amyloglucosidase (to hydrolyze starch fragments to glucose) at 60 °C; and 4 volumes of ethanol were added to precipitate soluble fibre. The residue is filtered; washed with 78% ethanol, 95% ethanol, and acetone; dried and weighed. One copy is analyzed for protein and the other is incubated at 525 °C to determine ash. TDF was obtained by subtracting the weight of protein and ash from the weight of the filtered and dried residue (Dodevska et al., 2013).

Sensory Analysis

To determine the sensory features and assessing the consumability of the produced biscuits, a 20-person panel comprising lecturers and undergraduate students at İstanbul Aydin University completed a sensory analysis. The biscuit samples were randomly named with 3-letter codes and presented to the panellists for analysis. The panellists were requested to assess the biscuits in terms of taste, smell, colour, crunchiness, crispness, texture and general approval. They were asked to give points on the rating form for the results of these criteria. Panelists were presented with the control sample and biscuit samples with different proportions of *spirulina* with codes. Panelists were given no information about the contents of the biscuits to ensure an objective assessment. Scales were

rated on a nine hedonic scale of 1: very bad, 2: bad, 3: moderate, 4: not good or bad, 5: good, and 6: very good. Average points of 5 or more were assessed as liked.

Statistical Analysis

One-way ANOVA was performed for statistical analysis and Tukey's test was chosen to measure the means of the results with significant differences ($P < 0.05$). Data analysis was conducted using the software package (JMP 9) (Nakov et al., 2018).

Findings and Discussion

Physical Properties

The degree of spread was identified in line with diameter and thickness measurements for gluten-free biscuit samples. The mean diameter, thickness and spread rates for gluten-free biscuit samples containing rice flour enriched with SPL are shown in Table 1. Thickness varied from 0.5-0.76, diameter from 5.44-6.06 and spread rate was 8.01-10.9. The SPL content affected thickness, diameter and spread. The lowest thickness was observed in SPLC biscuits and the highest was determined in the SPL3 sample ($p < 0.05$). In SPL1 and SPL2 samples, the thickness was found to be statistically similar ($p > 0.05$) and the 0.5% increase did not affect the thickness. The presence of SPL increased the diameter compared with the control. However, the proportional increase in SPL was not found to be statistically significant in diameter in SPL1, SPL2 and SPL3 samples ($p > 0.05$). SPL was found to be statistically significant on spread in biscuits ($p < 0.05$). The highest spreading rate was determined in control biscuits SPLC and the lowest was determined in SPL3 biscuits. A high SPL ratio increased the thickness and decreased the spreading rate. According to the study by Awan et al. (1995), the increase in protein in biscuits lowered the diameter and spread factors and increased the thickness of biscuits (Awan et al., 1995).

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

Table 1. Physical characteristics of biscuit samples

Biscuit Samples	SPL Ratio	Thickness of biscuit (mm)	Diameter of biscuit (cm)	Spread ratio
SPLC	Control	0.5±0.00 ^c	5.44±0.17 ^b	10.9±0.17 ^a
SPL1	0.50%	0.68±0.07 ^b	6.14±0.38 ^a	9.08±0.57 ^b
SPL2	1%	0.7±0.00 ^b	5.88±0.20 ^{ab}	8.40±0.23 ^c
SPL3	5%	0.76±0.12 ^a	6.06±0.12 ^a	8.01±0.59 ^c

Mean of 3 replicates ± SD, Means in a column not sharing the same superscript are significantly different at $p \leq 0.05$.

In another study, it was determined that wheat flour biscuits containing 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5% *Spirulina* powder affected the diameter and thickness very little compared to the control biscuits, and at the same time, increasing the addition of *Spirulina* powder decreased the spreading rate and volume of the biscuits (Ziena et al., 2020). It has been determined that *Spirulina* powder added to whole grain wheat, oat and barley flour at the rates of 0, 1, 2 and 3% reduces the cookie spreading rate. It has been explained that this is due to the fibre content

reducing the spreading rate of the cookies (Gupta et al., 2011; Onacik-Gür et al., 2018).

Chemical Properties

Data in Table 2 shows the chemical analysis findings for different biscuit samples made with different amounts of SPL powder. The humidity content of the samples was between 3.45% and 5.08%. Humidity contents increased depending on the increase in SPL. As stated in Table 2, no statistically significant difference was observed in fat contents ($p > 0.05$). Fat analysis in studies in the literature supports the result (Egea et al., 2014; Pop, 2022; Prakash & Pandey, 2023)

Table 2. Proximate chemical composition of biscuit samples

Parameters	SPLC(Control)	SPL1 (0.50%)	SPL2 (1%)	SPL3 (5%)
Humidity (%)	3.45±0.28 ^b	3.62±0.13 ^b	4.8±0.29 ^a	5.08±0.18 ^a
Ash (%)	0.80±0.02 ^b	0.81±0.02 ^b	0.82±0.03 ^b	1.25±0.01 ^a
Fat (%)	29.86±0.56 ^a	29.60±0.39 ^a	29.58±0.74 ^a	29.10±0.60 ^a
Protein (%)	7.28±0.02 ^c	8.23±0.01 ^b	8.35±0.01 ^b	10.60±0.02 ^a
TPC (mg GAE/100g)	33.13±0.40 ^d	42.4±4.36 ^c	59.28±0.60 ^b	64.18±0.10 ^a
Antioxidant (mg TE/100g)	108.31±6.18 ^b	121.80±1.12 ^b	215.94±5.6 ^a	251.86±3.43 ^a
FRAP (mg TEAC/100g)	36.27±0.40 ^c	37.27±0.0 ^c	54.74±1.0 ^b	60.66±0.30 ^a
Dietary Fibre (%)	0.91±0.01 ^d	1.22±0.02 ^c	1.95±0.03 ^b	2.72±0.01 ^a

Mean of 3 replicates ± SD, Means in a column not sharing the same superscript are significantly different at $p \leq 0.05$.

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

When the SPL proportion changed, the raw protein, ash, and dietary fibre contents of all biscuit samples significantly increased compared to the control sample (SPLC). Protein values from 7.28% to 10.60%, ash from 0.8% to 1.25%, dietary fibre from 0.91% to 2.72%. The highest protein content was determined in the SPL3 sample and the lowest SPLC sample. While it was determined that there were statistically significant differences dietary fibre values ($p < 0.05$). A similar study adding certain proportions of *Spirulina* powder to wheat flour found that the moisture proportion of the biscuits did not change, while protein and ash proportions increased linked to the increase in *Spirulina* powder (Ziena et al., 2020). Another study of biscuits supplemented with 0%, 2.5% and 4.0% of *S. platensis* grown in laboratory conditions found the %moisture was 2.1-2.91%, while crackers with 0%, 2.5% and 4.0% supplementation had %moisture 1.54-1.8% (Gün, 2019). Studies have emphasized that the protein content of *S. platensis* can reach up to 70% (da Rosa et al., 2015). It has been determined that *S. platensis* added to many products such as pasta, biscuits, yoghurt, chocolate, etc. increases the protein content (da Silva et al., 2019; Fradique et al., 2010; Rodríguez De Marco et al., 2014; Şahin, 2019). It has been stated that 0.25, 0.5 and 1% of *S. platensis* added to the ayran (a traditional Turkish drink) increased the protein in ayran from 17.17% to 22.61% (Çelekli et al., 2019). It has been determined that 2% *S. platensis* increases the protein values in homemade chocolates and biscuits (Şahin, 2019). It has been determined that 5, 10 and 20 g/100 g *spirulina* biomass used instead of wheat flour increases the protein level of pasta (Özyurt et al., 2015). It has been determined that there is no difference in protein between raw and cooked pasta and that proteins do not pass into the cooking water 100g^{-1} (Şahin, 2019). It was stated that *S. platensis* added to biscuits and crackers at 0%, 2.5% and 4% increased the protein content by 59.92% in biscuits and 43.47% in crackers (Gün, 2019). It has been determined that dietary

fibre content increases due to the increase in SPL. As seen in Table 3, dietary fibre content increased depending on the SPL increase. In their study, (Raczyk et al., 2022) found that the total dietary fibre of *spirulina* (8.45%) was significantly higher than that of semolina (4.44%). *S. platensis* powder evaluated by other authors has stated that they have various fibre contents such as 3%, 7.93% and 14.98% (Michalak & Chojnacka, 2015; Nicoletti, 2016; Ramírez-Rodrigues et al., 2021). Similar to literature studies on *S. platensis*, it is seen that it enriches the protein and dietary fibre content in rice flour biscuits.

Total Phenolic and Antioxidant Capacity

Phenolic compounds synthesized as secondary metabolites (El-Baky et al., 2009) are accepted as one of the most important classes of natural antioxidants and have received increasing interest from consumers of healthy foods (Machu et al., 2015). A study reported that *Spirulina* powder was a good raw material for healthy nutrition due to containing total phenolic and total flavonoids (Ziena et al., 2020). The phenolic and antioxidant content of biscuit samples in the study are shown in Table 2. Phenolic content was 33.13-64.18 mg GAE/100 g and antioxidants were 108.31-251.86 mg TE/100 g. It was observed that the addition of dried SPL to the biscuits had a statistically significant effect ($p < 0.05$) on the phenolic and antioxidant content when compared to the control samples. Biscuits containing SPL had higher phenolic and antioxidant content than SPLC, with the highest identified in SPL3 biscuits containing 5% SPL3 ($p < 0.05$). The potential use of *S. platensis* powder for gluten-free pasta was investigated by Fradinho et al. (2020). The results of the study detected that the contents of phenolic compounds, chlorophylls and carotenoids increased (Fradinho et al., 2020). It has been stated that the increase in the microalgae rate of *Arthrospira platensis* in biscuits from 2% to 6% leads to an increase in polyphenols and antioxidant capacity (Batista et al., 2017). Studies have shown that microalgal biomass increases the content of phenolic compounds, chlorophylls and carotenoids after its inclusion in recipes. Lupine-based protein

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

meat analogues containing *S. platensis* powder at a concentration of 15, 30 or 50% have been found to increase total phenolic and flavonoid content (Palanisamy et al., 2019). It has been determined that *Spirulina* added to dairy products increases the total phenolic, flavonoid and antioxidant contents of these products (Barkallah et al., 2017; Boyanova et al., 2022; Nazir et al., 2022). It was determined that the total phenolic content of *S. platensis* added to ice cream at the rates of .5%, 1% and 1.5% increased from 43.7 to -140.2 mg GAE/100g compared to the control sample (Boyanova et al., 2023). It was determined that bread to which 6% *Spirulina platensis* powder was added exhibited higher antioxidant activity than the control groups (Saharan & Jood, 2021).

Textural Characteristics

Textural properties of control biscuits and SPL added biscuits on days 1, 3, 5 and 7 day during 7

days of storage are given in Figure 2. Generally, hardness and brittleness values are determined when identifying the textural quality of biscuits (Banerjee et al., 2014; González et al., 2018). The hardness and brittleness values for biscuits with SPL added to the recipe were affected at statistically significant levels ($p < 0.05$). As the proportion of SPL in the biscuits increased, increases were observed in the hardness and brittleness values of the biscuits. During T7 day storage, the highest hardness and brittleness were determined in SPL3 biscuits and the lowest were determined in SPLC biscuits, which are control samples. This situation may be explained by the high fibre content in SPL creating a more compact biscuit texture. Similar results related to the change in textural features of biscuits were obtained in studies of biscuits enriched with foods containing high fibre content (Kulkarni & Joshi, 2013; Singh et al., 2012)

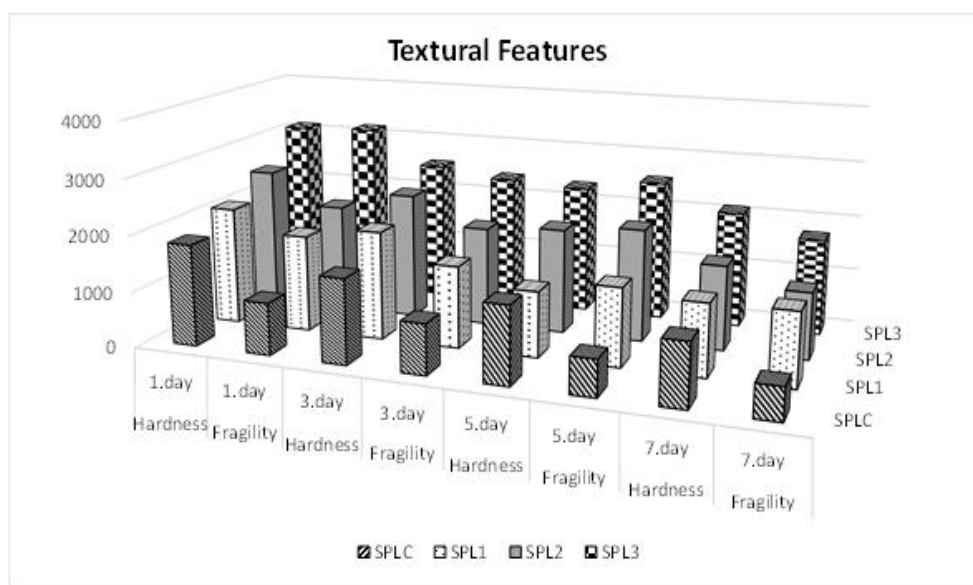


Figure 2. Textural properties of biscuits stored on days 1, 3, 5 and 7

Studies have shown that *S. platensis* provides positive contributions to products that exhibit hardness properties. It was determined that a functional Ricotta cheese enriched with different amounts of *spirulina* powder (0.25, 0.5, 0.75 and 1.0) g/100 g improved textural properties (Ismail et al., 2023). In a similar study, after *S. platensis* was added to yoghurt at four different

concentrations (0.25, 0.5, 0.75 and 1%), its textural properties were examined and it was found that yoghurts containing 25% *S. platensis* were similar to the control sample (Barkallah et al., 2017). *S. platensis* extracts have been found to affect the texture of cassava flour noodles, making them more chewy, dense and not easily broken (Al-Baarri et al., 2021). These studies

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

found that *S. platensis* added to cookies at 1%, 2% and 3% increased hardness due to moisture decrease (Onacik-Gür et al., 2018). It was determined that as the algae level and storage time (on the 1st, 5th and 10th day) of sponge cakes containing 0, 0.5, 1 and 1.5% *S. platensis* powder prepared with wheat flour increased, the textural parameters of the sponge cake (hardness, stickiness and cohesiveness) increased (Zangeneh et al., 2020). It was determined that the hardness of wheat flour biscuits containing 0.5, 1 and 1.5% *S. platensis* decreased with increasing microalgal biomass content. It has been stated that this situation results in the formation of weak gels when *S. platensis* is added to the dough. (Shahbazizadeh et al., 2015).

Colour Analysis

Table 3 shows the effect of SPL supplementation on the colour of the biscuit surface. All biscuits containing SPL had dark colors from 76.88 to 43.18 and darker colours had significantly lower L* readings. Among the colour values of the biscuit samples, the L*, a* and b* values of wheat flour statistically ($p < 0.05$) decreased with the addition of SPL determined. Generally, as the dried SPL in the biscuits increased, the L* values were significantly reduced. The a* value was 1.33 to -4.3, while the b* value was 25.27 to 6.25 and significantly reduced with the increase in SPL. Greener, darker biscuits were obtained with the addition of SPL

Table 3. Colour characteristics of biscuit samples

Biscuit Samples	SPL Ratio	L*	a*	b*
SPLC	Control	76.88±0.61 ^a	1.33±0.20 ^c	25.27±0.67 ^a
SPL1	0.50%	61.85±0.46 ^b	3.69±0.20 ^b	15.40±0.27 ^b
SPL2	1%	62.01±0.34 ^b	4.92±0.21 ^a	16.47±0.19 ^b
SPL3	5%	43.18±0.31 ^c	4.30±0.31 ^a	6.25±0.05 ^c

The mean of 3 replicates ± SD, Means in a column not sharing the same superscript are significantly different at $p \leq 0.05$

In a study, the effects of various concentrations of *S. platensis* microalgae on the drying kinetics and colour change of kiwi pastille were investigated. Concentrations of *S. platensis* did not affect the drying process. It has been found that it reduces a* and L* values (Khazaei Pool et al., 2016). It was determined that the a* values of shortbread biscuits with the addition of 0, 1, 3 and 6% *S. platensis* powder during storage became less dense with increasing storage time, while the b* values increased (Marcinkowska-Lesiak et al., 2018). It was determined that the colour of yoghurt samples enriched with 1.5% *S. platensis* powder and 0.5% milk protein changed from yellow to greenish (low a* and b*). It was determined that the amount of chlorophyll in *S.*

platensis powder caused colour change (Mesbah et al., 2022).

Sensory Properties

The gluten-free biscuit samples using rice flour and enriched with SPL were rated by 20 panellists for 6 categories of flavour, odor, colour, crispness, texture and general approval with objective approval of 1 (very bad), 2 (bad), 3 (moderate), 4 (neither good nor bad), 5 (good) and 6 (very good). Generally, which biscuit was chosen most and which were not chosen were determined. The mean scores for the 6 categories for the biscuits are presented in the sensory assessment graph in Figure 3.

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

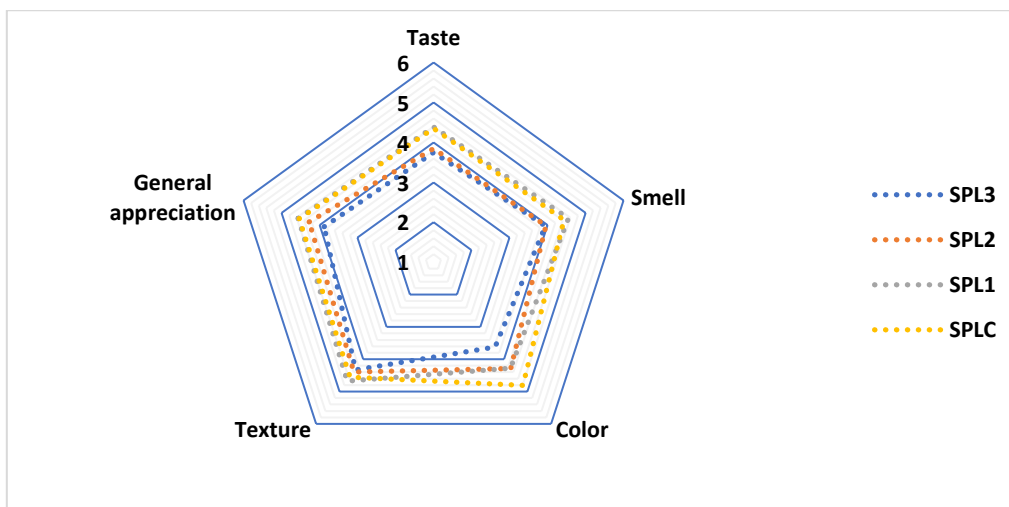


Figure 3. Sensory evaluation of biscuit samples

For assessment in terms of flavour, the 4 different biscuit samples had scores varying from 3.75 to 4.39. In terms of flavour, the most liked biscuit with 4.39 points contained 0.5% SPL1. Assessment in terms of odour for gluten-free biscuit samples found mean score varied from 3.94-4.55. The biscuit most liked in terms of odour contained 0.5% SPL1 and received 4.55 points. The least-liked biscuit contained 5% *S. platensis* and received 3.94 points. Assessment in terms of colour for gluten-free biscuit samples found mean scores were 3.62-4.81. The picture showing the colours of the biscuits can be seen in Figure 1. When biscuits are assessed in terms of colour, the most liked biscuit received 4.81 points and was the control sample. The biscuit samples containing 0.5% SPL1 and 1% SPL2 received equal points. When gluten-free biscuit samples were assessed in terms of crispness, scores varied from 4.86 to 5.25. The most liked biscuit in terms of crispness contained 0.5% SPL1 and received 5.25 points. The least liked biscuit contained 1% SPL and received 4.86 points. According to these results, the addition of a very small amount of SPL was identified to enhance the crispness of the biscuit. Assessment in terms of texture for gluten-free biscuit samples found mean scores varied from 4.33 to 4.68. In terms of texture, the most liked biscuit received 4.68 points and contained 0.5% SPL1. The least liked biscuit received 4.33 points and

contained 5% SPL3. In terms of general approval of gluten-free biscuit samples, the highest points were for the control biscuit and the biscuit with 0.5% SPL1 added. When examined in a general sense, the lowest point among the categories was 3.75. In other words, even the least chosen biscuit was identified to receive a moderate rating in terms of biscuit features. When examined in terms of category, it appears the best value of 5.25 points is equivalent to a good rating.

Conclusion

This study focused on the potential of *Spirulina platensis* powder as a functional ingredient in gluten-free biscuit production, highlighting its positive impact on nutritional, sensory, and physicochemical characteristics. The inclusion of *Spirulina platensis* powder significantly enhanced the protein, dietary fibre, phenolic content, and antioxidant properties of the biscuits, contributing to their health benefits. While higher rates of *Spirulina platensis* powder improved nutritional values, sensory analysis revealed a preference for biscuits with lower *Spirulina platensis* content, indicating a balance between nutritional enhancement and consumer acceptance is crucial. The findings suggest that *Spirulina platensis* powder can be effectively utilized in the development of gluten-free functional biscuits, offering a nutritious

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

alternative for consumers seeking healthier snack options. Future research could focus on optimizing the formulation to further improve the sensory appeal and nutritional profile of *Spirulina platensis* powder-enriched gluten-free biscuits.

References

- AACC. (2000). Approved methods of the American association of cereal chemists.
- Abdo, E. M., Shaltout, O. E.-S., El-Sohaimy, S., Abdalla, A. E., & Zeitoun, A. M. (2021). Effect of functional beetroot pomace biscuit on phenylhydrazine induced anemia in albino rats: Hematological and blood biochemical analysis. *Journal of Functional Foods*, 78, 104385.
- Ahsan, M., Habib, B., Parvin, M., Huntington, T. C., & Hasan, M. R. (2008). A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals.
- Al-Baarri, A., Aulia, R., Prahasiwi, E., Mawarid, A., Pangestika, W., & Lestari, F. (2021). The hardness analysis of noodles made from modified cassava flour, spirulina (*Spirulina platensis*) and basil leaves extract (*Ocimum sanctum* L.). IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Alongi, M., Melchior, S., & Anese, M. (2019). Reducing the glycemic index of short dough biscuits by using apple pomace as a functional ingredient. *LWT*, 100, 300-305.
- Arab, M., Razavi, S. H., Hosseini, S. M., Nayebzadeh, K., Meybodi, N. M., Khanniri, E., Mardi, P., & Mortazavian, A. M. (2019). Production and characterization of functional flavored milk and flavored fermented milk using microencapsulated canthaxanthin. *LWT*, 114, 108373.
- Awan, J., Rehman, A., Rehman, S., Siddique, M., & Hashmi, A. (1995). Evaluation of biscuits prepared from composite flour containing moth bean flour. *Pakistani Journal of Agriculture Science*, 32, 199.
- Banerjee, C., Singh, R., Jha, A., & Mitra, J. (2014). Effect of inulin on textural and sensory characteristics of sorghum based high fibre biscuits using response surface methodology. *Journal of food science and technology*, 51, 2762-2768.
- Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., Hadrich, B., Mechichi, T., Ayadi, M. A., Fendri, I., Attia, H., & Abdelkafi, S. (2017). Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT*, 84, 323-330. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.071>
- 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.
- Batista, A. P., Nunes, M. C., Fradinho, P., Gouveia, L., Sousa, I., Raymundo, A., & Franco, J. M. (2012). Novel foods with microalgal ingredients—Effect of gel setting conditions on the linear viscoelasticity of *Spirulina* and *Haematococcus* gels. *Journal of food engineering*, 110(2), 182-189.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analyt. Biochem.* 1996, 239, 70, 76.
- Boyanova, P., Bosakova-Ardenska, A., Gradinarska, D., Petkova, N., & Panayotov, P. (2023). Ice cream supplemented with *Spirulina platensis*: Antioxidant and color stability. AIP Conference Proceedings,
- Boyanova, P., Gradinarska, D., Dobрева, V., Panayotov, P., Momchilova, M., & Zsivanovits, G. (2022). Effect of *Spirulina platensis* on the quality and antioxidants characteristics of ice cream. BIO Web of Conferences,

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Antioxidative activity of phenolic composition of commercial extracts of sage and rosemary. *LWT*, 28, 25-30.
- Chen, C., Tang, T., Shi, Q., Zhou, Z., & Fan, J. (2022). The potential and challenge of microalgae as promising future food sources. *Trends in Food Science & Technology*.
- Committee, A. A. o. C. C. A. M. (2000). Approved methods of the American association of cereal chemists.
- Çelekli, A., Alslibi, Z. A., & Üseyin Bozkurt, H. (2019). Influence of incorporated *Spirulina platensis* on the growth of microflora and physicochemical properties of ayran as a functional food. *Algal Research*, 44, 101710.
- da Rosa, G. M., Moraes, L., Cardias, B. B., & Costa, J. A. V. (2015). Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. *Bioresource Technology*, 192, 321-327.
- da Silva, S. C., Fernandes, I. P., Barros, L., Fernandes, Â., Alves, M. J., Calhella, R. C., Pereira, C., Barreira, J. C., Manrique, Y., & Colla, E. (2019). Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. *Journal of Functional Foods*, 60, 103427.
- Di Cairano, M., Galgano, F., Tolve, R., Caruso, M. C., & Condelli, N. (2018). Focus on gluten free biscuits: Ingredients and issues. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 203-212.
- Dodevska, M. S., Djordjevic, B. I., Sobajic, S. S., Miletic, I. D., Djordjevic, P. B., & Dimitrijevic-Sreckovic, V. S. (2013). Characterisation of dietary fibre components in cereals and legumes used in Serbian diet. *Food Chemistry*, 141(3), 1624-1629.
- Egea, B., Campos, A., De Carvalho-Eliane, J. C. M., & Danesi, D. G. (2014). Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. *J Food Nutr Res*, 53(2), 171-179.
- El-Baky, H., El Baz, F. K., & El-Baroty, G. S. (2009). Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. *African Journal of Biotechnology*, 8(24).
- Fasano, A., & Catassi, C. (2012). Celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 367(25), 2419-2426.
- Fassano, A., & Catassi, C. (2012). Celiac disease. *N Engl J Med*, 367(25), 2419-2426.
- Foschia, M., Horstmann, S., Arendt, E. K., & Zannini, E. (2016). Nutritional therapy—Facing the gap between coeliac disease and gluten-free food. *International journal of food microbiology*, 239, 113-124.
- Fradinho, P., Niccolai, A., Soares, R., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I., & Raymundo, A. (2020). Effect of *Arthrospira platensis* (*spirulina*) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. *Algal Research*, 45, 101743.
- Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M., & Raymundo, A. (2010). Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1656-1664.
- González, J. D. T., Gallo, R. T., Correa, D. A., Gallo-García, L. A., & Castillo, P. M. (2018). Instrumental assessment of textural parameters of Colombian lemon biscuits. *Contemporary Engineering Sciences*, 11(22), 1085-1102.
- 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.
- Gupta, E., & Mishra, P. (2021). Functional food with some health benefits, so called

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

- superfood: A review. *Current Nutrition & Food Science*, 17(2), 144-166.
- Gupta, M., Bawa, A. S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Effect of barley flour and freeze-thaw cycles on textural nutritional and functional properties of cookies. *Food and Bioprocess Technology*, 89(4), 520-527.
- Gün, D. (2019). *Spirulina platensis ilavesi ile fonksiyonel bisküvi ve kraker geliştirilmesi* Doktora Tezi (Yüksek Lisans Tezi) Gaziantep
- Ismail, H. A., El-Sawah, T. H., Ayyash, M., Adhikari, B., & Elkot, W. F. (2023). Functionalization of Ricotta cheese with powder of spirulina platensis: physicochemical, sensory, and microbiological properties. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 1968-1983.
- Jnawali, P., Kumar, V., & Tanwar, B. (2016). Celiac disease: Overview and considerations for development of gluten-free foods. *Food Science and Human Wellness*, 5(4), 169-176.
- Jung, F., Krüger-Genge, A., Waldeck, P., & Küpper, J. H. (2019). Spirulina platensis, a super food? *Journal of Cellular Biotechnology*, 5, 43-54. <https://doi.org/10.3233/JCB-189012>
- Kaur, R., & Kaur, M. (2018). Microstructural, physicochemical, antioxidant, textural and quality characteristics of wheat muffins as influenced by partial replacement with ground flaxseed. *LWT*, 91, 278-285.
- Khazaei Pool, E., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., Azizpour, M., & Daneshzad, E. (2016). Examination of the effect of Spirulina platensis microalgae on drying kinetics and the color change of kiwifruit pastille. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10, 634-642.
- Kim, J.-M., & Shin, M. (2014). Effects of particle size distributions of rice flour on the quality of gluten-free rice cupcakes. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 526-532.
- Koh, H. S. A., Lim, S. E. V., Lu, J., & Zhou, W. (2020). Bioactivity enhancement of fucoidan through complexing with bread matrix and baking. *LWT*, 130, 109646.
- Kulkarni, A., & Joshi, D. (2013). Effect of replacement of wheat flour with pumpkin powder on textural and sensory qualities of biscuit. *International Food Research Journal*, 20(2), 587.
- Leonard, M. M., Sapone, A., Catassi, C., & Fasano, A. (2017). Celiac disease and nonceliac gluten sensitivity: a review. *Jama*, 318(7), 647-656.
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology advances*, 41, 107545.
- Liber, J. A., Bryson, A. E., Bonito, G., & Du, Z. Y. (2020). Harvesting microalgae for food and energy products. *Small Methods*, 4(10), 2000349.
- Machu, L., Misurcova, L., Vavra Ambrozova, J., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., & Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, 20(1), 1118-1133.
- Marcinkowska-Lesiak, M., Onopiuk, A., Zalewska, M., Ciepłoch, A., & Barotti, L. (2018). The effect of different level of Spirulina powder on the chosen quality parameters of shortbread biscuits. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), e13561.
- Marles, R. J., Barrett, M. L., Barnes, J., Chavez, M. L., Gardiner, P., Ko, R., Mahady, G. B., Dog, T. L., Sarma, N. D., & Giancaspro, G. I. (2011). United States pharmacopeia safety evaluation of Spirulina. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 593-604.
- Menegotto, A. L. L., de Souza, L. E. S., Colla, L. M., Costa, J. A. V., Sehn, E., Bittencourt, P. R. S., de Moraes Flores, É. L., Canan, C., & Colla, E. (2019). Investigation of techno-functional and physicochemical properties of Spirulina platensis protein concentrate for food enrichment. *LWT*, 114, 108267.

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

- Mesbah, E. E., Matar, A. A., & Karam-Allah, A. A. (2022). Functional properties of yoghurt fortified with *Spirulina platensis* and milk protein concentrate. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 13(1), 1-7.
- Michalak, I., & Chojnacka, K. (2015). Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences*, 15(2), 160-176.
- Nakov, G., Brandolini, A., Ivanova, N., Dimov, I., & Stamatovska, V. (2018). The effect of einkorn (*Triticum monococcum* L.) whole meal flour addition on physico-chemical characteristics, biological active compounds and in vitro starch digestion of cookies. *Journal of cereal science*, 83, 116-122.
- Naqash, F., Gani, A., Gani, A., & Masoodi, F. (2017). Gluten-free baking: Combating the challenges-A review. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 98-107.
- Nazir, F., Saeed, M., Abbas, A., Majeed, M. R., Israr, M., Zahid, H., Ilyas, M., & Nasir, M. (2022). Development, quality assessment and nutritive valorization of *Spirulina platensis* in yogurt spread. *Food Science and Applied Biotechnology*, 5(2), 106-118.
- Nicoletti, M. (2016). Microalgae nutraceuticals. *Foods*, 5(3), 54.
- Onacik-Gür, S., Żbikowska, A., & Majewska, B. (2018). Effect of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) addition on textural and quality properties of cookies. *Italian Journal of Food Science*, 30(1).
- Özyurt, G., Uslu, L., Yuvka, I., Gökdoğan, S., Atci, G., Ak, B., & Işık, O. (2015). Evaluation of the cooking quality characteristics of pasta enriched with *Spirulina platensis*. *Journal of food quality*, 38(4), 268-272.
- Palanisamy, M., Töpfl, S., Berger, R. G., & Hertel, C. (2019). Physico-chemical and nutritional properties of meat analogues based on *Spirulina*/lupin protein mixtures. *European Food Research and Technology*, 245, 1889-1898.
- Pasqualone, A., Bianco, A. M., Paradiso, V. M., Summo, C., Gambacorta, G., Caponio, F., & Blanco, A. (2015). Production and characterization of functional biscuits obtained from purple wheat. *Food Chemistry*, 180, 64-70.
- Pop, F. (2022). Improvement of the nutritional value of biscuits by the addition of *Spirulina* powder and consumer acceptance. *Journal of Agroalimentary Processes & Technologies*, 28(1).
- Prakash, G., & Pandey, V. (2023). Development and quality evaluation of cookies fortified with *Spirulina*.
- Raczyk, M., Polanowska, K., Kruszewski, B., Grygier, A., & Michałowska, D. (2022). Effect of *spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation on physical and chemical properties of semolina (*Triticum durum*) based fresh pasta. *Molecules*, 27(2), 355.
- Rai, S., Kaur, A., & Singh, B. (2014). Quality characteristics of gluten free cookies prepared from different flour combinations. *Journal of food science and technology*, 51(4), 785-789.
- Ramírez-Rodriguez, M. M., Estrada-Beristain, C., Metri-Ojeda, J., Pérez-Alva, A., & Baigts-Allende, D. K. (2021). *Spirulina platensis* protein as sustainable ingredient for nutritional food products development. *Sustainability*, 13(12), 6849.
- Rodríguez De Marco, E., Steffolani, M. E., Martínez, C. S., & León, A. E. (2014). Effects of *spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 102-108. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.054>
- Saharan, V., & Jood, S. (2021). Effect of storage on *Spirulina platensis* powder supplemented breads. *Journal of food science and technology*, 58(3), 978-984.
- Shahbazadeh, S., Khosravi-Darani, K., & Sohrabvandi, S. (2015). Fortification of Iranian traditional cookies with *spirulina platensis*. *Annual Research & Review in Biology*, 7(3), 144-154.

Effect of *Spirulina platensis* on Textural, Sensory and Some Physicochemical Characteristics in Gluten-free Functional Biscuit Production

- Singh, A., Rana, I., Sahi, N., Lohani, U., & Chand, K. (2012). Optimization of process variables for preparation of apple pomace-black soyflour based biscuits. *Int J Food Agri Vet Sci*, 2(1), 101-106.
- Singh, P., Singh, R., Jha, A., Rasane, P., & Gautam, A. K. (2015). Optimization of a process for high fibre and high protein biscuit. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1394-1403.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sudha, M., Vetrmani, R., & Leelavathi, K. (2007). Influence of fibre from different cereals on the rheological characteristics of wheat flour dough and on biscuit quality. *Food Chemistry*, 100(4), 1365-1370.
- Şahin, O. I. (2019). Effect of Spirulina biomass fortification for biscuits and chocolates. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(4), 583-587.
- Thirumdas, R., Brnčić, M., Brnčić, S. R., Barba, F. J., Gálvez, F., Zamuz, S., Lacomba, R., & Lorenzo, J. M. (2018). Evaluating the impact of vegetal and microalgae protein sources on proximate composition, amino acid profile, and physicochemical properties of fermented Spanish “chorizo” sausages. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(11), e13817.
- Verbeke, W. (2005). Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants. *Food quality and preference*, 16(1), 45-57.
- Wesley, S. D., André, B. H. M., & Clerici, M. T. P. S. (2021). Gluten-free rice & bean biscuit: characterization of a new food product. *Heliyon*, 7(1), e05956.
- Wirkijowska, A., Sobota, A., Zarzycki, P., Sykut-Domańska, E., & Teterycz, D. (2018). Effect of addition of barley wholemeal with different dietary fibre content on wheat bread quality. *Polish Journal of Agronomy*, 34, 44-51.
- Zangeneh, N., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Mehrnia, M. A. (2020). Investigation of the effect of different Spirulina platensis levels on nutritional, physicochemical and sensory properties of sponge cake. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 16(2), 207-220.
- Ziena, H. M., Rozan, M. A., & Ghozlan, H. E. (2020). Utilization of Spirulina (Arthrospira platensis) in the production of functional biscuits and its effect on product quality. *Alexandria Science Exchange Journal*, 41(October-December), 447-453.



Research Article

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

Fatma KÖYLÜOĞLU¹, Sedef AYDIN^{1*}, Gülcan ÖZKAN¹

ABSTRACT

Technological coadjuvants were utilized at the beginning of the malaxation phase of the olive oil extraction process. The present work aimed to evaluate the effect of different amounts of CaCO₃: NaCl combination at a rate of 1%, added to olive paste. The effects of coadjuvants' effect on the extraction yield and some quality parameters of oil obtained from Gemlik olives were investigated. According to the results, in terms of increasing yield, it was determined that the utilization of salt was more effective than calcium carbonate. Across all trials, the coadjuvants effectively mitigated increase in free acidity and peroxide levels. The amount of pigment increased with the addition of calcium carbonate and decreased with the addition of salt. Also, the addition of salt increased the amount of total phenolics and the contents of linoleic and palmitoleic acids. These findings highlight the superior efficacy of salt over calcium carbonate as a coadjuvant, increasing oil extraction yield while improving quality. Since salt is naturally occurring, inexpensive, easily accessible, and inert, it can provide the olive oil industry with a promising alternative coadjuvant.

Keywords: Calcium carbonate, salt, malaxation, olive oil, yield

Sızma Zeytinyağı Ekstraksiyonunun Yoğurma Prosesinde Yardımcı Katkı Maddesi Olarak Tuz ve Kalsiyum Karbonatın Kullanımı

ÖZ

Zeytinyağı ekstraksiyon prosesinde malaksasyon aşamasının başlangıcında teknolojik yardımcı maddelerden yararlanılmaktadır. Bu çalışmada, Gemlik zeytinlerinden elde edilen yağın ekstraksiyon verimi ve kalitesi üzerine malaksasyon aşamasında zeytin ezmesine eklenen %1 oranında farklı miktarlardaki CaCO₃: NaCl kombinasyonunun etkisi araştırılmıştır. Sonuçlara göre yağ verimi açısından tuz kullanımının kalsiyum karbonata göre daha etkili bir artışa sebep olduğu tespit edilmiştir. Tüm denemelerde CaCO₃ ve NaCl, yardımcı maddenin kullanılmadığı kontrol grubuna göre serbest asitlik ve peroksit seviyelerindeki artışları etkili bir şekilde hafifletmiştir. Renk maddelerinin miktarı kalsiyum karbonat ilavesiyle artmış, tuz ilavesiyle azalmıştır. Aynı zamanda tuz ilavesi toplam fenolik miktarı ile linoleik ve palmitoleik asit içeriklerini arttırmıştır. Araştırma sonuçları, tuzun bir yardımcı madde olarak kalsiyum karbonattan daha etkin olduğunu vurgulayarak, kaliteyi artırırken yağ ekstraksiyon verimini de artırmıştır. Doğal, uygun maliyetli, kolaylıkla bulunabilen ve inert özellikleri göz önüne alındığında tuz, zeytinyağı endüstrisi için umut verici bir alternatif yardımcı katkı maddesi özelliği sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kalsiyum karbonat, tuz, malaksasyon, zeytinyağı, verim

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0003-3491-4057, 0000-0003-0457-7731, 0000-0002-3333-7537

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 16.04.2024

Kabul Tarihi: 02.05.2024

¹ Suleyman Demirel University, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Isparta, Turkey

*E-posta: sedefaydin03@gmail.com

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

Introduction

Botanically, the cultivated olive tree belongs to the subspecies *Olea europaea sativa* of the Oleaceae family (Hashmi *et al.*, 2015). Turkey holds a significant position in olive oil production, yielding 225.000 tons in the 2019/20 season, which is noteworthy compared to other producing countries (IOOC, 2021). Olive cultivation is widespread across various regions in Turkey, including Marmara, Aegean, Mediterranean, and Southeastern Anatolia. Notably, the Gemlik variety predominates in the Marmara region, constituting over 80% of the total table olives produced (Ozturk *et al.*, 2021). Gemlik olives, known for their high oil content, are largely used for oil extraction, making them the most popular and growing olive variety in Turkey.

Beyond its sensory attributes, the Gemlik variety is favored by consumers for its health benefits attributed to its fatty acid composition and antioxidant content (Lazzez *et al.*, 2008). The advancement of extraction technologies is imperative for olive oil producers to achieve high-quality oil. Commercially, the best olive oil is obtained through physical processes such as washing, pressing, centrifuging, and filtering (TGK, 2017). The primary objective of olive oil production is to maximize oil extraction while preserving important bioactive components such as phenols, tocopherols, sterols, and desired flavor compounds.

Malaxation, a critical phase in olive paste processing, is indispensable for obtaining extra virgin olive oil (EVOO). Numerous studies have investigated the effects of kneading temperature and time on olive oil quality (Çevik *et al.*, 2015; Aydın *et al.*, 2020; Dalgic *et al.*, 2016; Delil *et al.*, 2022). During the malaxation process of the extraction, not all the oil can be released from the olives. However, part of the oil becomes an emulsion with plant water or remains in the olive paste's colloidal structure. Depending on several conditions, some olive pastes are considered difficult to extract the oil from their emulsified structure (Cruz *et al.*, 2007). To address this, co-adjuvants such as salt, talc, and calcium carbonate are commonly added during malaxation to facilitate oil extraction by

breaking emulsions (Köylüoğlu and Özkan, 2012).

Studies investigating the influence of coadjuvants in olive oil extraction have recently increased in Spain, Italy, and other Mediterranean countries. Recent studies in Mediterranean countries have studied the efficacy of co-adjuvants such as warm water, enzymes, salt, micronized talc, and calcium carbonate in increasing oil extraction efficiency and improving oil quality (Elsorady, 2020; Squeo *et al.*, 2016; Tamborrino *et al.*, 2017; Clodoveo *et al.*, 2013). Calcium carbonate is a co-adjuvant known for its affordability and inert qualities, and acts as an absorbent medium that promotes the coalescence and separation of oil. (Dentel, 1991; Tamborrino *et al.*, 2017). Additionally, it is approved as a coadjuvant by European Union regulations (CE Directive 30/2001). One of the first mineral resources and a potent demulsifier, salt, or sodium chloride, is also acknowledged as a co-adjuvant. Its efficacy during the kneading process comes from the physical phenomena of separating the hydrophilic phase from the oil due to its density and higher ionic characteristics (Cruz *et al.*, 2007). Given these considerations, it would be beneficial to investigate the impact of salt and calcium carbonate on both the oil extraction efficiency and the quality parameters of the Gemlik variety (Dentel, 1991; Tamborrino *et al.*, 2017).

This study aims to evaluate the potential of calcium carbonate, salt, and their combination as co-adjuvants in olive oil extraction, particularly focusing on the Gemlik variety. Although there exists literature regarding the fruit and oil quality of Gemlik olives (Diraman and Dibeklioğlu, 2009; Demirag and Konuskan, 2021), investigations into the benefits of co-adjuvant utilization for Gemlik olive oil extraction have been lacking in the scientific literature. Specifically, there is an important gap in the current literature concerning the advantageous application of co-adjuvants in the process of extracting olive oil from Gemlik olives.

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

Material And Methods

Material

The research's material, the Gemlik olive variety, cultivated in the Manavgat district of Gundogdu town, Antalya province. Olives were harvested from all aspects of the olive trees, ensuring representation of the sample area at optimal ripeness (5.71). Following physical analysis, olive oil extraction was promptly conducted. The resulting olive oils were stored in opaque glass bottles at -20°C until subjected to physical-chemical analysis.

Determination of Moisture and Oil Content

Olive samples were weighted (2 g) and dried until a constant weight in an oven (Nüve, FN500, Turkey) at 105°C, the moisture was expressed as percent (%). Approximately 2 g of dried paste samples were weighed and extracted with 150 ml of hexane in a Soxhlet for about 4 hours, and the results were expressed as g oil/100 g dry sample (Guinda et al., 2003). The analyses were carried out in triplicate.

Olive Oil Extraction

An Abencor system with a two-phase vertical centrifuge system (Haus Centrifugal Technologies, Aydin, Turkey) consisting of laboratory-scale mini crusher (100 kg/h), kneader (malaxator, 250 rpm), and mini vertical centrifuge decanter (maximum: 5800 rpm) was used for olive oil extraction. 1 kg of olive paste was crushed in a mini crusher and turned into olive paste. Following, it was kneaded at 35°C for 45 minutes by adding coadjuvants in the determined proportions (Table 1). The paste obtained from kneading was kept in a two-phase mini vertical centrifugal decanter operating at 5080 rpm for 5 minutes, and olive mill wastewater and olive oil were separated from the olive pomace. After dehumidifying the olive oils with sodium carbonate, they were stored in dark glass bottles at -20 °C until analysis. The total amount of crude oil was calculated as g oil/100 g dry sample.

Table 1. Trials used in olive oil extraction with and without coadjuvants.

Trials	CaCO3(%)	:	NaCl(%)
Control	0	:	0
Trial-1	100	:	0
Trial-2	75	:	25
Trial-3	50	:	50
Trial-4	25	:	75
Trial-5	0	:	100

Oil extraction yield (OEY, %) was calculated with the help of the formula given below (1):

$$OEY (\%) = (\text{Crude Oil (g oil/100 g dry sample)} / \text{Total oil amount}) * 100$$

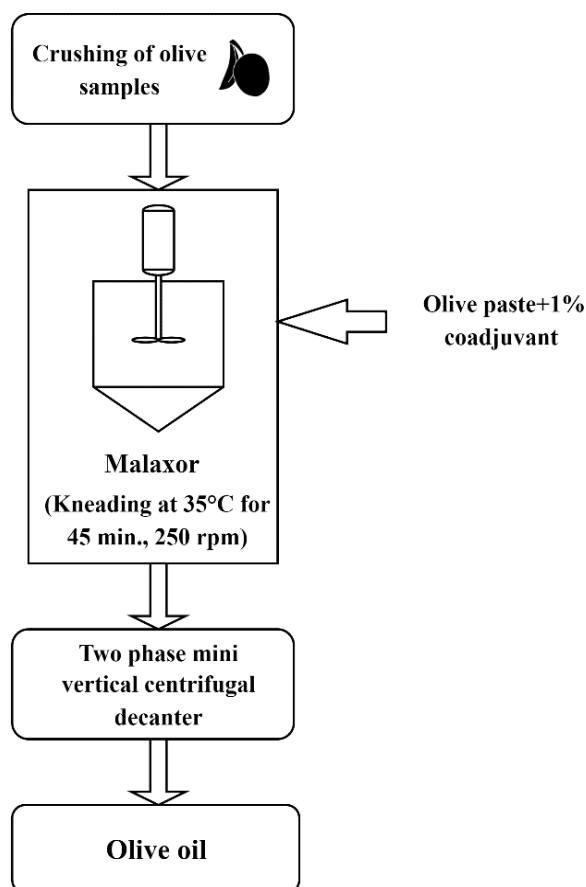


Figure 1. Flow Diagram of Oil Extraction

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

Determination of Physicochemical Properties

Determination of Free Acidity (FFA), Peroxide value (PV), Absorbance values (K_{232} , K_{270}), and Refractive Index (RI)

Free acidity, given as percent oleic acid, was determined according to AOCS Official Method Ca 5a-40, peroxide value (meq O₂/kg oil) with AOCS Official Method Cd 8-53 (AOCS, 2003) and specific absorbance values (K_{232} , K_{270}) in UV light were determined by the Codex Alimentarius (2001). All the parameters were determined in triplicate for each sample. The refractive index of virgin olive oil samples was measured with a 60/70 Abbe Refractometer (Bellingham+Stanley Ltd., England).

Determination of the Total Chlorophyll (TCL) and Carotenoid Content (TCC)

The amount of chlorophyll and carotenoid of the oils was determined using the method defined by Isabel Minguez-Mosquera et al. (1991). Total carotenoid (3) and total chlorophyll (4) amounts were calculated using the following formula:

$$\text{The amount of carotenoid (mg carotenoid/kg oil)} \\ = (A_{470} \times 10^6) / (2000 \times 100 \times L) \quad (3)$$

$$\text{The amount of chlorophyll (mg chlorophyll /kg oil)} \\ = (A_{670} \times 10^6) / (613 \times 100 \times L) \quad (4)$$

A_λ is the absorbance, and L is the spectrophotometer cell thickness (1 cm). All the parameters were determined in triplicate for each sample.

Determination of Total Phenolic Content (TPC)

Phenolics in olive oil extracted with methanol: water (80:20, v/v) mixture and total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method (T70+UV/VIS spectrophotometer, PG Instruments, England) (Singleton and Rossi, 1965). Results were calculated as mg gallic acid equivalent (GAE)/kg oil using the calibration curve.

detector was set at 295 nm for excitation and 330 nm for emission. The peak integration and the quantitative calculations were performed with

Determination of Fatty Acid Composition (FAC)

The fatty acid composition of the Gemlik oil was determined by gas chromatography (Shimadzu GC-17A GC-Gas Chromatograph equipped with silica capillary column (Cp WAX 52 CB 50 m*0.32 mm, 1.2 μ m)) as fatty acid methyl esters (FAMES). The methyl esters and fatty acid composition of olive oils were determined by the modifying method Ce 1-62 (AOCS, 2003). The oil samples (50 μ l) were converted into FAMES. Accordingly, derivatization was carried out by adding 500 μ l 0.5% Na-Methylate (0.5 g Na-Methylate + 80 ml methanol + 20 ml iso-octane) to 50 μ l oil and keeping it overnight at room temperature. Before the injection, 1 ml of hexane was added, and 5 μ l of the clarified supernatant was injected. The flow rate of helium, used as carrier gas at a flow rate of 15 cm s⁻¹; split ratio was 1/10 ml min⁻¹. The temperature of both injector and flame ionization detector was 250°C. Column temperature was set up according to the following temperature program: 60 °C, hold for 4 min; 4 °C min⁻¹ up to 175 °C; hold for 27 min; 4 °C min⁻¹ up to 215 °C; hold for 5 min; 4 °C min⁻¹ up to 240 °C. In the determination of fatty acids, a mixture of methyl esters of 37 fatty acids from butyric acid to nervonic acid (SUPELCO (LB-81678)) was used as a standard. The fatty acid composition of the samples was calculated in area (%).

Tocopherols (TCP) Analysis

Tocopherol component analysis of olive oils was carried out by modifying the AOCS Official Method (Ce 8-89) (AOCS, 2003). 250 μ l of olive oil was dissolved in the mobile phase Heptane/THF (95:5, v/v) solvent, and the volume was completed to 1 ml. Following, 100 μ l of sample was injected into the high-performance liquid chromatography (HPLC-Agilent 1100 (Waldbronn, Germany), equipped with a fluorescence detector and Luna silica column (Phenomenex, 250*4.6 mm, 5 μ m). The flow rate was 1.2 mL/min, and the fluorescence

the calibration curve. In the analysis, α -(alpha), β -(beta), γ -(gamma), and δ -(delta) tocopherols (Cabliochem, Germany) were used as standards.

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

Statistical analysis

The SPSS (Chicago, IL, USA) statistical program was used to analyze the data obtained. The significance of the difference between the combinations (at a 1% confidence level) was evaluated by the analysis of variance, while the difference between the groups was determined by the Duncan one-way comparison test.

Results

Physical and Physicochemical Characteristics of Gemlik Olive Oil

The degree of ripening, moisture content (%), and oil content (%) of the Gemlik olive variety were determined to be 5.71, 45.07, and 61.10%, respectively, based on their physical characteristics. Compared to the literature, the oil content of the Gemlik variety in this study was higher than 61.10% (Köylüoğlu and Özkan, 2012; Tanilgan et al., 2007; Demirag and Konuskan, 2021).

Physicochemical evaluation of olive oil provides information on its authenticity and safety. Therefore, in this study we assessed the oil yield, free acidity, and values of peroxide, K_{232} , K_{270} , ΔK of olive oil (Table 2).

Table 2. OEY (%), FFA (% oleic acid), PV (meq O₂/kg oil), K_{232} - K_{270} and ΔK values of Gemlik olive oil (n=3)

Trials	OEY	FFA	PV	K_{232}	K_{270}	ΔK
Control	59.37±0.65 ^c	0.68±0.01 ^a	7.59±0.12 ^a	1.45±0.04 ^{abc}	0.08±0.01 ^a	0.00±0.00 ^a
Trial-1	56.47±0.45 ^d	0.58±0.01 ^c	7.31±0.03 ^{ab}	1.50±0.02 ^{ab}	0.08±0.01 ^a	0.00±0.00 ^a
Trial-2	61.92±0.69 ^b	0.63±0.01 ^b	7.46±0.13 ^a	1.43±0.02 ^{bc}	0.06±0.01 ^{abc}	0.00±0.00 ^a
Trial-3	64.22±0.37 ^a	0.65±0.01 ^{ab}	7.28±0.06 ^{ab}	1.40±0.03 ^c	0.06±0.00 ^{bc}	0.00±0.00 ^a
Trial-4	64.69±0.06 ^a	0.66±0.02 ^{ab}	6.71±0.24 ^c	1.42±0.03 ^c	0.05±0.01 ^c	0.00±0.00 ^a
Trial-5	65.16±0.47 ^a	0.66±0.01 ^{ab}	6.85±0.03 ^{bc}	1.51±0.03 ^a	0.06±0.01 ^{abc}	0.00±0.00 ^a

*The mean values marked with the same letter in the same column are not statistically different from each other ($p \leq 0.001$); **Please see Table 1 for trials.

When Table 2 is examined, statistically the highest OEY (%) was found in the trial-5 (65.16), and the lowest OEY was found in the trial-1 (56.4). The addition of calcium carbonate reduced the yield of oil, whereas salt increased it. Tamborrino et al. (2017) found that using of calcium carbonate lowered OEY, which is consistent with our findings. However, Espínola et al. (2009) showed that high calcium carbonate dosages led to higher extraction efficacy. The use of salt during malaxation resulted in higher levels of OEY than calcium carbonate. This could be because the salt has stronger emulsion breaking impact than calcium carbonate does. In

this study, adding of a higher amount of salt and calcium carbonate to the olive paste during the malaxation process had no significant effect on OEY. When calcium carbonate is added in a lower amount, the hygroscopic characteristic of the carbonate helps in extracting oil by causing the olive paste emulsion to breakdown. As a consequence, the oil droplets coalesce into larger drops. In other words, the decrease in OEY with the addition of more calcium carbonate could be related to the coadjuvant's ability to retain oil (Squeo et al., 2016).

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

By the current study, all the samples comply with the EU limits (Reg. EU 2568/91) for FFAs, PV, K_{232} , and K_{270} for extra virgin olive oil. The results of free acidity, peroxide value, K_{232} , and K_{270} varied between 0.58-0.68 (oleic acid%), 6.71-7.59 (meq O_2 /kg oil), 1.40-1.51, and 0.05-0.08, respectively (Table 2). The results indicated that the increase in free acidity and peroxide was suppressed in all trials that used the coadjuvants. Similar to the current study, different researchers reported that the FA and PV decreased with an increase in calcium carbonate concentration (Tamborrino et al., 2017). In the current study, it was determined that the use of calcium carbonate caused a slight decrease in acidity and peroxide values compared to the use of salt. Moya et al. (2010) and Khaleghi et al. (2023) obtained similar results to ours in their study. In contrast with our results, some studies found that adding calcium carbonate increased the levels of acidity and peroxide (Elsorady, 2020; Espínola et al., 2009; Espínola et al., 2015).

The ΔK value is a measure that changes with the refining process and is known as a value used to determine whether olive oils are virgin or refined (Kiralan et al., 2008). There was no statistically significant difference between the trials in the ΔK values. In line with current results, Moya et al. (2010) and Tamborrino et al. (2017) indicated that calcium carbonate did not statistically affect K_{232} and K_{270} values. According to Pérez et al. (2008), K_{232} and K_{270} values increased as the amount of salt used increased. K_{232} and K_{270} values of oils by using salt, calcium carbonate, and their combinations were lower than those of the control group. The study indicated that while the differences between yield, peroxide, free acidity, K_{232} and K_{270} values were significant at $p \leq 0.001$; the difference between ΔK values was not found to be statistically significant.

RI, TCL, TCC, Pa, TPC and TCP of Gemlik Olive Oils

Chlorophyll, carotenoids, and pheophytin a are pigments responsible for the color of olive oil. In addition, pheophytin a is reduction product of chlorophyll and is a pigment that gives a mat green color to olive oil. The RI values of all samples were found to be 1.47 (Table 3). In agreement with the current study, Tanilgan et al. (2007) also reported the refractive index of Gemlik olive oil as 1.47. The values of TCL, TCC, and pheophytin-a for the control, trial-1, trial-2, trial-3, trial-4, and trial-5 are displayed in Table 3 and found as 0.29-0.39, 0.01-0.10, and 0.24-0.45 (mg/kg), respectively. Higher amounts of pheophytin-a, carotenoids, and chlorophylls were detected in trials utilizing calcium carbonate compared with trials using salt. According to Cruz et al. (2007) and Elsorady (2020), adding salt increased the amount of total carotenoid and chlorophyll in olive oil. This is consistent with the findings of Moya et al. (2010), who demonstrated that the amounts of carotenoids and chlorophylls in olive oil were not significantly affected by calcium carbonate. Phenolic compounds play a very important role in increasing the oxidation stability of virgin olive oil due to their natural antioxidant properties. In trials, TPC ranged from 70.82 to 133.92 mg GAE/kg oil. The trial with the highest salt concentration (Trial 5) exhibited the highest total phenolic content with 133.92 mg GAE/kg oil.

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

Table 3. RI, TCL (mg/kg), TCC (mg/kg), pheophytin a (mg/kg) and TPC (mg GAE/kg oil) values of olive oil.

Trials	RI	TCL	TCC	pheophytin a	TPC
Control	1.47±0.00 ^a	0.33±0.11 ^a	0.31±0.03 ^a	0.07±0.01 ^{ab}	103.93±1.79 ^c
Trial-1	1.47±0.00 ^a	0.41±0.19 ^a	0.33±0.07 ^a	0.01±0.01 ^c	71.99±0.58 ^e
Trial-2	1.47±0.00 ^a	0.45±0.14 ^a	0.39±0.06 ^a	0.01±0.01 ^c	70.82±2.11 ^e
Trial-3	1.47±0.00 ^a	0.36±0.07 ^a	0.36±0.03 ^a	0.02±0.01 ^{bc}	94.38±1.35 ^d
Trial-4	1.47±0.00 ^a	0.30±0.05 ^a	0.32±0.02 ^a	0.04±0.02 ^{bc}	112.30±2.68 ^b
Trial-5	1.47±0.00 ^a	0.24±0.08 ^a	0.29±0.04 ^a	0.10±0.02 ^a	133.92±3.25 ^a

*The mean values marked with the same letter in the same column are not statistically different from each other ($p \leq 0.001$); **Please see Table 1 for trials.

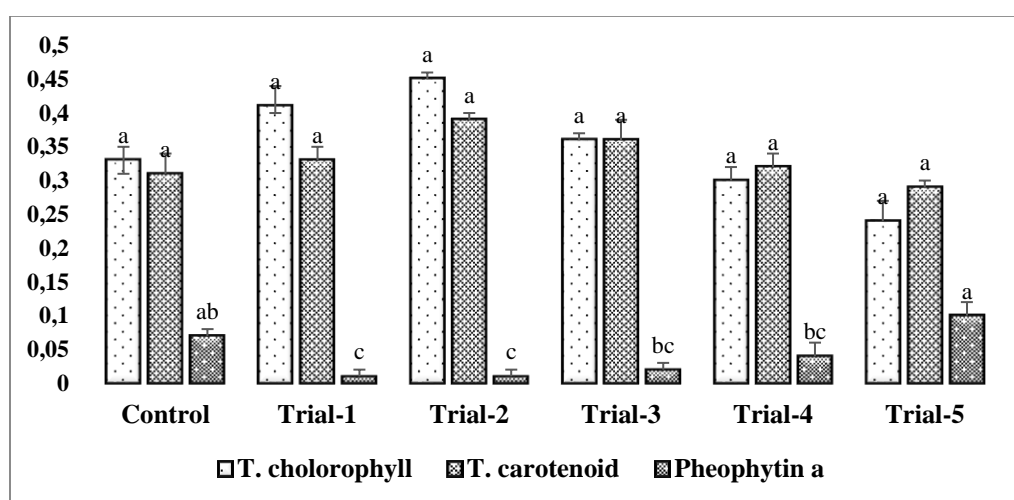


Figure 2. Average values for olive oil TCL (mg/kg), TCC (mg/kg), and pheophytin a (mg/kg). Duncan one-way comparison test results ($n=3$). The mean values marked with the same letter in the same column are not statistically different from each other ($p \leq 0.001$). Please see Table 1 for trials.

Trial 2 had the lowest phenolic concentration (70.82 mg GAE/g oil), and it also had the highest calcium carbonate ratio. Trials' phenolic concentrations differed considerably ($p \leq 0.001$). The TPC increased with higher salt concentrations and decreased with the usage of calcium carbonate. This might be explained by the fact that calcium carbonate retains phenolic compounds in oil by binding water. Additionally, it may be related to the increased amount of salt that affects the transition of phenolics into the oil (Pérez *et al.*, 2008). In

accordance with our findings, Pérez *et al.* (2008) and Elsorady (2020) showed that the addition of salt during the malaxation process raised the total phenolic content in olive oil. While Khaleghi (2023) demonstrated a rise with the addition of a coadjuvant, Moya *et al.* (2010) determined no significant effect of calcium carbonate on TPC. The means of the TPC and α -TCL values of olive oils produced using calcium carbonate, salt, and their combinations are shown in Figure 3.

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

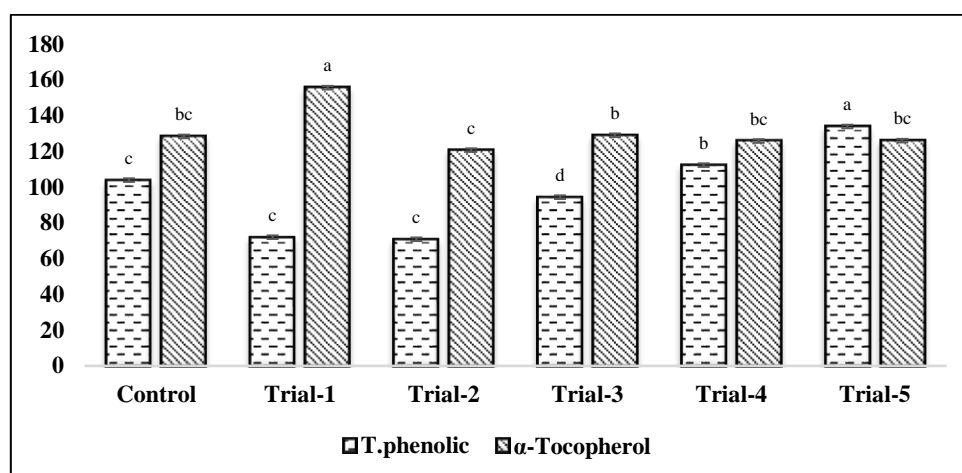


Figure 3. Average values for olive oil total phenolic content (mg GAE/kg oil) and α -tocopherol (mg/kg oil) Duncan one-way comparison test results (n=3). The mean values marked with the same letter in the same column are not statistically different from each other ($p \leq 0.001$). Please see Table 1 for trials.

FAC of Gemlik Olive Oils

The averages of the fatty acid components of the olive oils produced by using calcium carbonate, salt, and their combinations are given in Figure 4 and Figure 5. In the current trials, oleic (C18:1), palmitic (C16:1), and linoleic acids (C18:2) were determined as the major compounds, and stearic, palmitoleic and linolenic acids were found as minor compounds (Figures 4 and 5). The amount of (%) oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, stearic acid, and palmitoleic acid ranged from 60.24 to 67.93; 14.11 to 22.63; 11.85 to 13.10; 2.97 to 3.86; and 1.52 to 1.96, respectively. In addition, it should be mentioned that all fatty acids except linolenic were within the range of IOOC (2021). In the current study, the amount of linolenic acid

ranged from 0.00 to 1.34. The amount of oleic acid exhibited higher concentrations in the control group compared to the coadjuvant-applied oil. (Figure 4). The findings revealed that the addition of calcium carbonate had no effect on the level of palmitic acid (C16:1), but that it increased when using additional salt. Concerning the amount of linoleic acid, there was no statistically significant difference between the trials and the control group. Khaleghi et al. (2023) also found that the addition of calcium carbonate did not affect the amount of linoleic acid, which is in line with our findings.

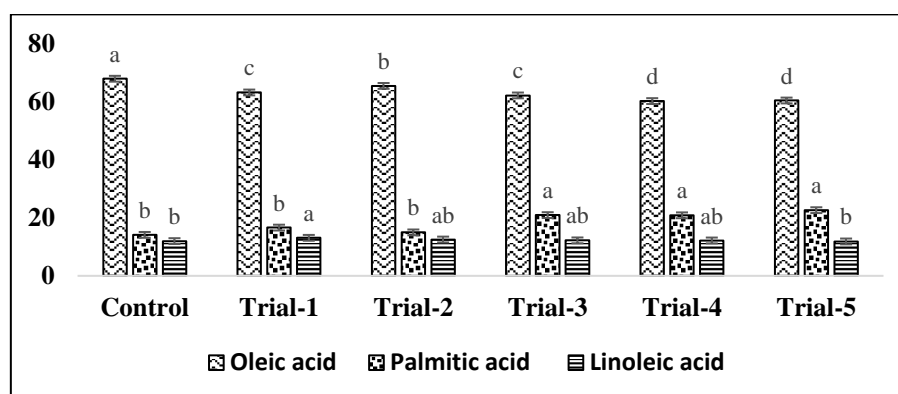


Figure 4. Average values for the major fatty acid components; Oleic acid(C18:1), Palmitic acid(C16:0), Linoleic acid (C18:2) (%). Please see Table 1 for trials.

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

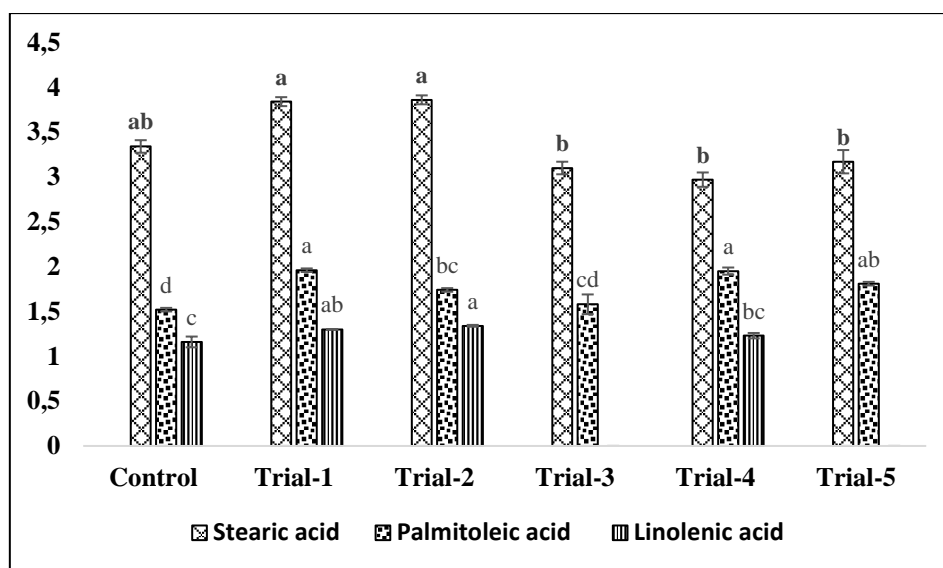


Figure 5. Average values for olive oil minor fatty acid components (%):Stearic acid (C16:0), Palmitoleic acid and Linolenic acid. Please see Table 1 for trials.

The addition of coadjuvants had no noticeable impact on the minor fatty acid amounts (Figure 5). Furthermore, according to other research, adding calcium carbonate has a minimal effect on fatty acid levels (Cruz et al., 2007; Moya et al., 2010; Elsorady, 2020; Khaleghi, E. et al., 2023). The percentages of palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, and linolenic acid displayed statistically significant differences at the $p \leq 0.001$ level for trials and the $p \leq 0.01$ level for oleic acid levels.

Conclusion

The utilization of salt as a coadjuvant for the production of olive oil highlighted a positive effect on yield. On the other hand, a decrease in yield was observed with an additional amount of calcium carbonate. Regarding the physicochemical effects of applied coadjuvants, the addition of salt in the process increased the acidity value and pheophytin a content whereas calcium carbonate applied oil had lower peroxide and K values. The refractive indexes of olive oil obtained in different trials were similar. Trials 2 and 3 have a higher pigment transition to oil from paste than the control and other trials. The highest amount of TPC was determined in the control and trials 4 and 5, while the lowest

TPC was found in trials 2, 3, and 4. Also, in the current study, calcium carbonate and salt applications slightly affect the fatty acid composition of olive oil.

As a result, both coadjuvants had a more positive effect on oil yield and some olive oil quality parameters compared to the control group. However, the application of salt during the malaxation process was found to be more advantageous than calcium carbonate. Therefore, salt can be recommended as a coadjuvant to produce olive oil. According to FAO/WHO, salt is inexpensive and widely available, with no daily consumption restriction. Consequently, it could potentially be recommended as a natural coadjuvant by the olive oil industry.

References

- AOCS, 2003. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society Methods Cd 3d-63, Cd 8b-90, and Ch5-91, 5th edn. AOCS Press, Champaign.

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

- Aydın S., Özkan G. and Yorulmaz A. (2020). Çeşit, Olgunluk ve Yoğurma Şartlarının Zeytinyağının Sterol Profili Üzerine Etkisi. *Akademik Gıda*, **18**, 87-95. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.730207>
- Clodoveo, M.L., Durante V. and La Notte D. (2013). Working towards the development of innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil. *Ultrasonics sonochemistry*, **20**, 1261-1270. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.02.001>
- Codex Alimentarius, (2001). Codex Standard for olive oil, virgin. and refined, and for refined olive-pomace oil. Codex Standard. 33- 1981 (Rev. 1- 1989).
- Cruz, S., Yousfi, K., Pérez A.G., Mariscal C. and Garcia J.M. (2007). Salt improves physical extraction of olive oil. *European Food Research and Technology*, **225**, 359-365. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0423-9>
- Çevik, Ş., Özkan, G. and Kiralan, M. (2015). Çeşit, Olgunluk ve Yoğurma Şartlarının Zeytinyağı Verimi, Bazı Kalite Parametreleri ve Aroma Profili Üzerine Etkisi. *Akademik Gıda*, **13**, 335-347.
- Dalgic, L., Ozkan G. and Karacabey, E., (2016). Altın Çilek Çeşnili Zeytinyağı Üretiminde İşlem Koşullarının Kalite Parametreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi ve Optimizasyonu. *SDU Journal of the Faculty of Agriculture/SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **11**, 21-34.
- Delil, S.O.S., Özkan, G. and Karacabey, E. (2022). Phenolic Transition from Olive Fruits at Different Ripening Stages to Olive Oil: Process Optimization and Determination by Spectrophotometric and Chromatographic Methods. *Food Analytical Methods*, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s12161-022-02364-6>
- Demirag, O. and Konuskan, D.B. (2021). Quality properties, fatty acid and sterol compositions of East Mediterranean region olive oils. *Journal of Oleo Science*, **70**, 51-58. <https://doi.org/10.5650/jos.ess20179>
- Dentel, S.K. (1991). Coagulant control in water treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **21**, 41-135. <https://doi.org/10.1080/10643389109388409>
- Dıraman, H. and Dibeklioğlu, H. (2009). Characterization of Turkish virgin olive oils produced from early harvest olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **86**, 663-674. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1392-5>
- Elsorady, M.E. (2020). Effect Of Using Some Extraction Coadjuvants On Extraction Yield And Quality Of Olive Oil Extracted From Some Egyptian Olive Cultivars. *Annals. Food Science and Technology*, **21**.
- Guinda, A., Dobarganes, M.C., Ruiz-Mendez, M.V. and Mancha, M. (2003). Chemical and physical properties of a sunflower oil with high levels of oleic and palmitic acids. *European journal of lipid science and technology*, **105**, 130-137. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390028>
- Hashmi, M.A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U. and Perveen, S. (2015). Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**. <https://doi.org/10.1155/2015/541591>
- IOOC (2021). *International Olive Oil Council. Available from: https://www.internationaloliveoil.org/worlds-olive-oil-production-has-tripled.*

Utilizing Salt and Calcium Carbonate as Coadjuvants in Malaxation Process of Virgin Olive Oil Extraction

- accessed January 2021 [Online]. [Accessed]. <https://doi.org/10.3390/agronomy11020295>
- Isabel Minguez-Mosquera, M., Rejano-Navarro L., Gandul-Rojas, B., SanchezGomez, A.H. and Garrido-Fernandez, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **68**, 332-336. <https://doi.org/10.1007/BF02657688>
- Khaleghi, E., Moghadam, H.N., Mortazavi, S.M.H. (2023). The effects of processing aids and techniques on olive oil extractability and oil quality indices. *Grasas y Aceites* **74**(1), e494-e494.
- Kıralan, M., Bayrak, A., Çalıkoglu, E. (2008). Effect of nigella seed extract on oxidative stability of refined sunflower oil. *Asian Journal of Chemistry*, **20**, 3313-3318.
- Köylüoğlu, F. and Özkan, G. (2012). Yardımcı katkı maddeleri kullanımının zeytinyağı verim ve kalite parametreleri üzerine etkisi. *Electronic Journal of Food Technologies*, **7**, 32-45.
- Lavee, S. and Wodner, M. (2004). The effect of yield, harvest time and fruit size on the oil content in fruits of irrigated olive trees (*Olea europaea*), cvs. Barnea and Manzanillo. *Scientia Horticulturae*, **99**, 267-277. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00100-6)
- Moya, M., Rainola, F., Fernández, D.G., de Torres, A., Marcos, J., Vilar, J., Josue, J., Sánchez, T. and Castro, E. (2010). Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *Journal of food engineering*, **97**, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.09.015>
- Ozturk, M., Altay, V., Gönenç, T.M., Unal, B.T., Efe, R., Akçiçek, E. and Bukhari, A. (2021). An overview of olive cultivation in Turkey: Botanical features, eco-physiology and phytochemical aspects. *Agronomy*, **11**, 295.
- Pérez, A.G., Romero, C., Yousfi, K. and García, J.M. (2008). Modulation of olive oil quality using NaCl as extraction coadjuvant. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **85**, 685-691. <https://doi.org/10.1007/s11746-008-1252-8>
- Singleton, V.L., Rossi, J.R. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolibdic-Phosphothungstic Acid. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144- 158.
- Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso V., Pasqualone, A. and Caponio, F., (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chemistry*, **209**, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.028>
- Tamborrino, A., Squeo, G., Leone, A., Paradiso, V.M., Romaniello, R., Summo, C., Pasqualone, A., Catalano, P., Bianchi, B. and Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, **205**, 34-46. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.019>
- Tanilgan, K., Özcan, M.M. and Ünver, A. (2007). Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils. *Grasas y aceites*, **58**, 142-147. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i2.78>
- TGK (2017). Türk Gıda Kodeksi, Zeytinyağı ve Prina Yağı Tebliği (TebliğNNo:2017/26). Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Resmi Gazete.



Araştırma Makalesi

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Merve USLU¹, Hatice Kübra ŞAŞMAZ¹, Esra ERELİ¹, Hasim KELEBEK*¹

ÖZ

Bu çalışmada, Adana ilinde satılan 21 farklı kuru incir örneğinin şeker bileşimi, antioksidan kapasitesi, toplam fenolik madde miktarı, aflatoksin B₁ (AFLB₁) toplam aflatoksin (AFLB₁+ AFLB₂+ AFLG₁+ AFLG₂) ve okratoksin A (OTA) gibi mikotoksin analizleri yapılarak toksik özellikleri değerlendirilmiştir. Kuru incirlerin antioksidan aktivitesini belirlemek için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazollin-6-sülfonik asit) (ABTS) yöntemleri kullanılmıştır. Şeker bileşimi, OTA ve aflatoksin analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır. Kuru incir örneklerinin %90.5'lik kısmının aflatoksin ve % 76.2'lik kısmının OTA bakımından Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirtilen limitleri aşmadığı belirlenmiştir. İncirlerin toplam fenolik madde, antioksidan kapasite bakımından oldukça zengin potansiyele sahip olduğu ve glikozun baskın şeker olduğu saptanmıştır. Bu çalışma, Adana'da satılan kuru incirlerin antioksidan kapasitesi ve düzeyleri açısından önemli bir değerlendirme sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ficus carica, aflatoksin, fenolikler, mikotoksin, antioksidan kapasite, şeker

Evaluation of Bioactive Properties, Aflatoxin and Ochratoxin A Levels of Dried Figs

ABSTRACT

In this study, the sugar composition, antioxidant capacity, total phenolic content, aflatoxin B₁ (AFLB₁), total aflatoxin (AFLB₁+ AFLB₂+ AFLG₁+ AFLG₂), and ochratoxin A (OTA) mycotoxin analyses of 21 different dried fig samples sold in Adana province were performed and their toxic properties were evaluated. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazollin-6-sulphonic acid) (ABTS) methods were used to determine the antioxidant activity of dried figs. Sugar composition, OTA, and aflatoxin analyses were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). It was determined that 90.5% of the dried fig samples did not exceed the limits specified in the Turkish Food Codex Contaminants Regulation regarding aflatoxin and 76.2% regarding OTA. It was determined that figs have a high potential in terms of total phenolic content, antioxidant capacity and glucose is the dominant sugar. This study evaluates the antioxidant capacity and mycotoxin levels of dried figs sold in Adana.

Keywords: Ficus carica, aflatoxin, phenolics, mycotoxin, antioxidant capacity, sugar

ORCID ID(Yazar sırasına göre)

0009-0008-6648-4956, 0000-0003-4728-3151, 0009-0005-9424-5483, 0000-0002-8419-3019

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 19.05.2024

Kabul Tarihi: 15.06.2024

¹ Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Adana Bilim ve Teknoloji Üniversitesi, Adana

*E-posta: hkelebek@atu.edu.tr

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Giriş

İncir (*Ficus carica*), dünyanın çeşitli subtropikal bölgelerinde yetiştirilen 800'den fazla ağaç, çalı ve epifit türünün bulunduğu Moraceae familyasına ait bilinen en eski kültür bitkilerinden biridir (Hajam ve Saleem 2022) ve Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetiştirilmesinin yanı sıra Kaliforniya, Avustralya ve Güney Amerika gibi Akdeniz ikliminin hakim olduğu ülkelerde de ticari üretimi yapılmaktadır (Ersoy ve ark., 2017). Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nın incir üretim verileri incelendiğinde, dünya çapındaki incir üretiminin büyük kısmı Türkiye'de (%25,2) olup, bunu Mısır (%15,9), Fas (%11,4), Cezayir (%9,2) ve İran (%8,5) takip etmektedir (FAO, 2021).

İncir meyveleri karbonhidratlar, aminoasitler (lösin, triptofan, fenilalanin, lizin ve histidin, asparajin, alanin, glutamin, serin, glisin ve sistein) organik asitler, mineraller (potasyum, kalsiyum ve demir) açısından zengindir (Morovati ve ark., 2022). İncir meyvelerinde glikoz ve fruktoz baskın monosakkarittir ve malik asit ve sitrik baskın organik asitlerdir (Veberic ve Mikulic-Petkovsek, 2016). İncirler içerdikleri fenolik bileşiklere ve organik asitlere bağlı olarak antioksidan, antidiyabetik, antikanser, nöroprotektif etki, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktivitelere sahiptir (Yang ve ark., 2023).

Taze incirin sınırlı dayanıklılığı (7-10 gün) ve taşınma zorluğu, dünya genelinde tanınmasını kısıtlamıştır. Bu meyve, fiziksel hasarlara karşı son derece hassastır ve bu nedenle depolama ömrü çok kısadır, bu da onu taze yerine kurutulmuş olarak tüketime daha uygun hale getirmektedir. Meyvelerin kurutularak saklanması, tarihsel olarak kullanılan etkili gıda koruma yöntemlerinden biridir (Aksoy, 2001). Kuru incir, diğer meyvelerle karşılaştırıldığında yüksek bir polifenol konsantrasyonuna sahiptir ve lif, bakır, manganez, magnezyum, potasyum, kalsiyum ve K vitamini açısından zengindir. Doğrudan tüketilmesinin yanı sıra, konsantre şurup, şarap veya sirke üretiminde de kullanılmaktadır (Desa ve ark., 2019).

Fiziksel, kimyasal, mikrobiyal ve besinsel olmak üzere dört ana grubu kapsayan kurutulmuş meyvelerin genel kalitesini belirleyen birkaç

temel özellik bulunmaktadır. Kurutulacak incirlerde aranan en önemli kriterler, yüksek şeker ve çözünür katı madde içeriği, düşük asit içeriği, açık renkli ve yumuşak dokulu olmasıdır (Aksoy, 2017). Ayrıca kuru incir ticareti için görsel çekicilik, organoleptik özellikler (gözeneklilik, doku, rehidrasyon özellikleri, lezzet), fizikokimyasal özellikler (su aktivitesi vb.) ve güvenlik (mikrobiyal yük, zararlılar ve kirleticiler) diğer kurutulmuş meyvelerde olduğu gibi kalite parametrelerinin başında gelmektedir (Schilter ve ark., 2003; Şen ve ark., 2017).

İncir yüksek oranda şeker içermesi, uygun nem içeriği ve uygunsuz hasat ve hasat sonrası koşulları nedeniyle küf ve birden fazla mikotoksin oluşumunun sıklıkla görüldüğü bir gıdadır (Gilbert ve Senyuva 2008). Mikotoksinler, başta *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* ve *Claviceps* olmak üzere farklı filamentli küfler tarafından üretilen çok çeşitli doğal ikincil metabolitlerdir. Başlıca yaygın mikotoksinler arasında aflatoksinler, deoksinivalenol, zearalenon, okratoksin A (OTA), fumonisinler ve patulin bulunmaktadır (Afsah-Hejri ve ark., 2013). Mikotoksinlerle kontaminasyon, gıda zehirlenmesi vakalarının yanı sıra uluslararası ticaret sorunlarına da sıklıkla sebep olmaktadır (Shephard, 2008). Kuru incirde yaygın olarak tespit edilen mikotoksin türlerinden biri *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) enfeksiyonundan gelişen Aflatoksindir. Bu bileşikler, Gıda ve İlaç İdaresi tarafından çok düşük eşik değerlerinde izlemeye ve ürün reddine tabidir (Dünya Sağlık Örgütü, 2012). İncirin aflatoksinle kontaminasyonu ağaç üzerinde başlamakta kurutma, paketlenme ve satışa kadar olan sürecinde devam etmektedir. Ayrıca OTA ve fumonisinler de fazlaca bulunabilmektedir. Bu toksik fungal metabolitlerin görülme sıklığı, ihraç edilen kontamine ürünlerin reddedilmesi nedeniyle üreticilerin ekonomik kayıplarına yol açmaktadır (Heperkan ve ark., 2012). Ayrıca, kuru incirlerde bildirilen diğer ilgili mikotoksinler fumonisin B₁, kojik asit, fusarik asit ve tenuazonik asittir (Di Sanzo ve ark., 2018; Sulyok ve ark., 2020). İncirdeki toksisiteyi ve sıklıkları nedeniyle, birçok ülke tüketicilerin sağlığını korumak amacıyla mikotoksinler için düzenlemeler oluşturmuştur (Trucksess ve Scott,

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

2008). Bu toksin bileşikleri için limitler, mikotoksin türünün yanı sıra ülkeler arasında da değişebilmektedir. Yasal sınırın üzerinde aflatoksin veya okratoksinlerle kirlenmiş incirler, bu mikotoksinlerin kanserojen, mutajenik ve teratojenik olma potansiyeline sahip olması nedeniyle mevcut haliyle tüketilememektedir (Abrunhosa ve ark., 2016). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), mevcut bilimsel kanıtlara dayanarak mikotoksinlerin kanserojenliğini beş grupta (Grup 1, 2A, 2B, 3 ve 4) sınıflandırmıştır (IARC, 2006; IARC, 2016). Aflatoksin B₁ (AFLB₁), Grup 1 kanserojen olarak sınıflandırılırken OTA Grup 2B olası kanserojenler olarak sınıflandırılmıştır (Ostry ve ark., 2017).

Uluslararası Kuruyemiş ve Kuru Meyve Konseyi'nin (INC) yayınladığı 2019/2020 istatistiksel incelemesine göre Türkiye, yaklaşık 90.000 ton üretimle küresel kuru incir talebinin %55'inden fazlasını karşılamaktadır ve kuru incirin ana üreticilerinden biri olarak bilinmektedir (INC, 2021). Bu toksik bileşiklerin miktarını tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışma, ülkemizde gerek sağlığa yararı gerekse ihracatı ile ekonomiye katkısı bakımıyla önemli yere sahip olan kuru incirin, aflatoksin, okrotoksin ve kalite parametrelerini incelemek amacıyla ele alınmıştır. Bu kapsamda Adana ilinin farklı satış noktalarından alınmış kuru incir örneklerinin, AFLB₁, toplam aflatoksin (AFLB₁+AFLB₂+AFLG₁+AFLG₂) ve OTA gibi mikotoksin analizleri yapılarak toksik özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra genel bileşimlerinin ve biyoaktif özellikleri saptanması amaçlanmıştır.

Materyal-Yöntem

Materyal

Çalışmamızda kullanılan toplam 21 adet kuru incir örneği, Adana ilindeki toptan/perakende satış noktalarından, "Gıda Maddelerinde Mikotoksinlerin Seviyesinin Resmi Kontrolü İçin Numune Alma, Numune Hazırlama ve Analiz Metodu Kriterleri Tebliği (Tebliğ No:2007/21)" esas alınarak tesadüfi örnekleme yöntemine göre alınmıştır. Örnekler alfabeğe göre adlandırılmıştır. Temmuz-Ağustos aylarında 2021 yılı mahsulü kuru incirler orijinal

ürün ambalajlı ve dökme olarak en az 500 g olacak şekilde satış noktalarından satın alınmıştır. Bekleme süresince soğuk ve ışsız ortamda muhafaza edilmiştir.

Kimyasallar

PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi), metanol (HPLC saflıkta), sodyum hidrokisit, potasyum bromür (KBr), sodyum asetat, nitrik asit etanol (HPLC grade), asetonitril (HPLC), Folin-Ciocalteu reaktifi, formik asit Merck'ten (Darmstat, Almanya); şeker standartları (glikoz, fruktoz, laktoz, sakaroz) Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, ABD) temin edilmiştir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS [2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asit)] ve Trolox ((+/-)-6-hidroksi-2,5, 7,8-tetrametil-kroman-2-karboksilik asit), Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, ABD) ve etanol Riedel de Haen Co. (Seelze, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Aflatoksin standardı (Trilogy-2.6 µg/mL), Okratoksin standardı (Trilogy-10 µg/mL) kullanılmıştır. HPLC'de mobil fazların hazırlanmasında ultra saf su kullanılmıştır. Standart çözeltiler ve diğer hassas çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır.

Yöntem

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu

Kuru incirlerden 5 gram örnek alınarak üzerine 20 ml metanol/su (80/20) ilave edilmiş ve 25 °C sabit sıcaklıkta, 60 dakika süreyle karıştırılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen ekstrakt 5500 rpm'de 15 dakika 4°C'de santrifüj (Hettich Universal 320R) edilmiş ve üstteki berrak kısım alınıp 0.45 µm'lik membran filtrelerden (Whatman Inc., Clinton, NJ, ABD) süzülerek antioksidan kapasite ve fenolik madde analizleri yapılmıştır (Kelebek ve ark. 2009).

Antioksidan aktivite tayini

Kuru incirleri antioksidan aktivite DPPH ve ABTS olmak üzere iki farklı yöntemle belirlenmiştir. Serbest radikalleri önleme yeteneğini ölçebilen DPPH (2,2, difenil 1-pikri hidrazil) reaktifi kullanılarak ve metanol içerisinde gerçekleşen reaksiyonun zamana karşı değişiminin 515 nm'de UV-Vis (Agilent -Cary 60) spektrofotometredeki ölçüm sonuçlarına

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

göre yapılmıştır (Brand-Williams ve ark., 1995; Kelebek ve ark., 2009). ABTS yöntemi Kelebek ve ark., (2017)'nin yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntem için 7 mM ABTS (2,2'-Azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic asit) 2.45 mM potasyumbisülfat ile karıştırılarak karanlık ortamda 12-16 saat bekletilmiş ve daha sonra bu solüsyon sodyum asetat (pH 4.5) tamponu ile UV-VIS spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda 0.700 ± 0.01 absorbans verecek şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra 20 µl kuru incir ekstraktlarına 2.98 ml hazırlanan tampon karıştırılarak spektrofotometrede 734 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri Trolox (10-100 µmol/L) standart eğim çizelgesi ile hesaplanarak sonuçlar mmol/L trolox cinsinden ifade edilmiştir.

Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde analizi, Shahidi (2015)'in uyguladığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. 20 ml ekstrakt üzerine Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edilmiş 3 dakika bekletilerek üzerine 1 ml %20'lik sodyum karbonat çözeltisi eklenmiştir ve daha sonra 0.9 ml distile su eklenmiş ve karıştırılmıştır. 1 saat oda koşullarında karanlıkta bekletilen karışım UV spektrofotometre (Agilent Carry 60) kullanılarak 765 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit (31,25–500 ppm) standart eğrisi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğerleri (GAE)/100 gram kuru madde cinsinden ifade edilmiştir.

Şeker Tayini

Kuru incirde şeker analizleri için, 4 g örnek alınıp üzerine 20 ml 5 mM'lık sülfürik asit çözeltisi (mobil faz) eklenerek 60 dakika süresince ekstraksiyon yapılmıştır. Bu süre sonunda elde edilen ekstrakt 6500 devir/ 20 dakikada 4°C'de santrifüj (Hettich Universal 320R) edilmiş ve 0.45 µm'lik membran filtrelerden geçirilerek süzümüştür (Lee ve Coates, 2000). Shimadzu Prominence-i LC-2030C enjekte edilerek örneklerdeki şeker miktarları belirlenmiştir. Çalışmada, Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm) (Bio-Rad, California, USA) kolon ve taşıyıcı faz olarak 5 mM'lık

sülfürik asit çözeltisi kullanılmıştır ve bu fazın akış hızı 0.5 ml/dakika olarak ve izokritik sistemle sağlanmıştır. Bileşiklerinin miktarlarının saptanması amacıyla, her bir standart madde için beş farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır ve cihaza enjekte edilerek her bir bileşik için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve bu eğrilerden de bileşiklerin miktarları saptanmıştır. Örneklerdeki şeker konsantrasyonlarının belirlenmesi refraktif indeks dedektörü (RID) kullanılarak dış standart yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Aflatoksin B₁ (AFLB₁) toplam aflatoksin (AFLB₁+ AFLB₂+ AFLG₁+ AFLG₂) tayini Örnek hazırlama

Kuru incir örneklerinin analizi için AOAC Resmi Yöntemi 999.07 (Stroka ve ark., 2000) kullanılmıştır. 50 gram numune üzerine 300 ml metanol:su (240:60) ve 5 g NaCl ilave edilmiştir ve bir Waring blender kullanılarak 3 dakika süreyle karıştırılmıştır.

Ekstrakt kaba filtre kağıdından geçirilmiş ve süzütüden 10 ml alınarak üzerine 60 ml PBS ilave edilmiş ve iyice karıştırılarak numune seyreltilmiştir. Seyreltilmiş ekstraktının tamamı immuni affinite kolonundan (Aokin AG, Berlin, Almanya) 1-2 damla/saniye akış hızında geçirilmiştir. Kolon 20 ml (2 x 10 ml) su ile yıkanmıştır. Kolondan 1-2 damla/saniye hızla 0.5 ml metanol (HPLC Grade) geçirilmiştir ve 1 dakika beklendikten sonra 0.75 ml metanol eklenmiştir. Son olarak kolona 1.75 ultra saf su eklenerek tamamının kolondan geçmesi sağlanmıştır. Süzüntü, küçük vialde alınmış ve HPLC cihazına enjeksiyonu yapılmıştır.

Kromatografik analiz

Kromatografik analiz, floresans dedektörüne (HPLC-FLD) bağlanmış bir Shimadzu (Tokyo, Japonya) yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Kolon fırınının sıcaklığı 25 °C'de tutulmuştur ve mobil faz olarak distile su-asetonitril-metanol (600 /200 /300 v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Çözeltinin 1 litresine elektrokimyasal türevlendirme için 120 mg KBr ve 350 µl 4 mol HNO₃ ilave edilmiştir. İzokritik bir elüsyon programı ile 1 ml/dk akış hızı kullanılmıştır. Floresan detektörü, uyarılma ve emisyon için

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

sırasıyla 360 ve 440 nm dalga boylarına ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 100 µl olarak ayarlanmış ve ODS-3 C18 (250 x 4,6 mm) kolonu kullanılmıştır. Analiz süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir. Numunelerin cihaza enjeksiyonundan önce kalibrasyon eğrisi, hazırlanmış olduğumuz standart solüsyonu kullanarak kontrol edilmiş ve her bir numuneden 100 µl enjeksiyon yapılarak analizler yürütülmüştür.

Aflatoksin B₁ (AFLB₁) toplam aflatoksin (AFLB₁+ AFLB₂+ AFLG₁+ AFLG₂) Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti

Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışması için kontrol örneğine 0.5 ppb

düzeyinde AFLB₁, G₁ ve 0.125 ppb AFLB₂, AFLG₂ standardı eklenerek 10 adet geri alma çalışması yapılmıştır. LOD ve LOQ, geri kazanım deneylerinin verilerine dayanarak ISO11843 bölüm 2'ye göre hesaplanmıştır. LOD'ler, kontrol örneğinin 10 tekrarlı analizinin standart sapmasının (SD) üç katı olarak (3 x SD), LOQ'lar karşılık gelen SD'nin 10 katı (10 x SD) olarak, tayin limitleri (LOD) ise sırasıyla, AFLB₁ 0.15 ppb, AFLB₂ 0.03 ppb, AFLG₁ 0.11 ppb ve AFLG₂ 0.04 ppb olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde ölçüm limitleri (LOQ), AFLB₁ için 0.5 ppb, AFLB₂ için 0.11 ppb, AFLG₁ için 0.35 ppb ve AFLG₂ için 0.13 ppb olarak belirlenmiştir. HPLC cihazında aflatoksin tayin ve ölçüm limitleri Tablo 1 'de verilmiştir.

Tablo 1. Aflatoksin tayin ve ölçüm limitleri

Sıra	AFLB ₁ (0.5 ppb)	AFLB ₂ (0.125 ppb)	AFLG ₁ (0.5 ppb)	AFLG ₂ (0.125 ppb)
1	0.36	0.10	0.38	0.11
2	0.40	0.11	0.43	0.12
3	0.40	0.11	0.42	0.11
4	0.38	0.10	0.42	0.11
5	0.41	0.11	0.39	0.11
6	0.46	0.13	0.45	0.11
7	0.49	0.11	0.47	0.11
8	0.49	0.12	0.47	0.12
9	0.47	0.13	0.48	0.15
10	0.47	0.13	0.46	0.12
Ort	0.43	0.11	0.44	0.12
S.Sapma	0.05	0.01	0.04	0.01
3xS.Sapma	0.15	0.03	0.11	0.04
10xS.Sapma	0.50	0.11	0.35	0.13
LOD	0.15	0.03	0.11	0.04
LOQ(Hesaplanan)	0.50	0.11	0.35	0.13

Lineer ölçüm aralığını belirlemek amacıyla; AFLB₁ standartları 0.25 ppb, 0.5 ppb, 1 ppb, 2 ppb, 4 ppb ve 8 ppb konsantrasyon düzeylerinde olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda hazırlanarak Agilent 1100 HPLC cihazına üç tekrarlı olacak şekilde enjekte edilmiş ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Geri kazanım çalışmalarında kontrol örneğine maksimum kalıntı limiti (MRL) olan 10 ppb düzeyinde AFLB₁, AFLG₁ ve 2.5 ppb AFLB₂, AFLG₂ standardı eklenerek okumalar yapılmıştır. Geri kazanım değerleri, AFLB₁ için 9.2 µg/kg, AFLB₂ için 2.25 µg/kg, AFLG₁ için 8.9 µg/kg,

AFLG₂ için 2.26 µg/kg olarak belirlenmiştir ve bu değerler Tablo 2'de verilmiştir.

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 2. Geri kazanım çalışmalarında AFLB₁, AFLB₂, AFLG₁, AFLG₂ oranları

Aflatoksin	Eklenen Toksin Miktarı (µg/kg)	HPLC Geri Kazanım Değeri (µg/kg)	Aflatoksin Geri Kazanım Değeri (%)
AFLB ₁	10	9.2	92
AFLB ₂	2.5	2.25	90
AFLG ₁	10	8.9	89
AFLG ₂	2.5	2.26	91

Okratoksin A (OTA) Analizi

Örnek hazırlama

Kuru incir örneklerinin analizi için, AOAC Official Method 2000.03 metodu uygulanmıştır. 25 gram numune üzerine 150 ml asetonitril:su (90:60) ilave edilmiştir ve bir waring blenderi kullanılarak 3 dakika süreyle karıştırılmıştır. Ekstrakt kaba filtre kağıdından geçirilmiştir. Süzüntüden 4 ml alınarak üzerine 44 ml PBS ilave edilmiş ve iyice karıştırılarak numune seyreltilmiştir. Seyreltilmiş ekstraktın tamamı immuni affinite kolonundan (PriboMIP™, Çin) 5 ml/dk akış hızında geçirilmiştir. Kolon 10 ml (2 x 10 ml) su ile yıkanmış ve ardından. 1-2 damla/saniye hızla 1 ml metanol (HPLC Grade) geçirilmiştir. Son olarak kolona 1 ml ultra saf su eklenerek tamamının kolondan geçmesi sağlanmıştır. Süzüntü küçük vialere alınmış ve HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

Kromatografik analiz

Kromatografik analiz, floresans dedektörüne (HPLC-FLD) bağlanmış bir Shimadzu (Tokyo, Japonya) yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir. Kolon fırınının sıcaklığı 40 °C'de ayarlanmış ve mobil faz olarak su-asetonitril-asetik asit (510/480/10 v/v/v) karışımı kullanılmıştır. İzokritik bir elüsyon programı ile 1 ml/dk akış hızı kullanılmıştır. Floresan detektörü, uyarılma ve emisyon için sırasıyla 333 ve 443 nm dalga boylarına ayarlanmıştır. HPLC sistemine

enjeksiyon hacmi 100 µl olarak belirlenmiş ve ODS-3 C18 (250 x 4,6 mm) kolonu kullanılmıştır. Çalıştırma süresi 20 dakika olarak belirlenmiştir. Numunelerin cihaza enjeksiyonundan önce kalibrasyon eğrisi hazırlanmış olduğumuz standart solüsyonu kullanarak kontrol edilmiş ve her bir numuneden 100 µl enjeksiyon yapılarak analizler yürütülmüştür.

Okratoksin A Tayin Limiti ve Ölçüm Limiti

Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ) çalışması için kontrol örneğine 1ppb düzeyinde OTA standardı eklenerek 10 adet geri alma çalışması yapılmıştır. LOD ve LOQ, geri kazanım deneylerinin verilerine dayanarak ISO11843 bölüm 2'ye göre hesaplanmıştır. LOD'ler, kontrol örneğinin 10 tekrarlı analizinin standart sapmasının (SD) üç katı olarak h (3 x SD), LOQ'lar karşılık gelen SD'nin 10 katı (10 x SD) olarak ve Tayin limitleri (LOD) 0.14 ppb, ölçüm limitleri (LOQ) 0.48 ppb olarak belirlenmiştir. HPLC analizinde OTA tayin ve ölçüm limitleri Tablo 3.'te verilmiştir. Lineer ölçüm aralığını belirlemek amacıyla; OTA standartları 0.25 ppb, 0.5 ppb, 1 ppb, 3 ppb, 5 ppb ve 10 ppb konsantrasyon düzeylerinde olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda hazırlanarak Shimadzu HPLC cihazına her biri üç tekrarlı olacak şekilde enjekte edilmiş ve kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 3. OTA tayin limiti ve ölçüm limiti çalışması

Sıra	1 ppb
1	0.87
2	0.94
3	0.9
4	0.84
5	0.95
6	0.93
7	0.93
8	0.92
9	0.95
10	1.02
Ort	0.9250
S.Sapma	0.0488
LOD=3xS.Sapma	0.1465
LOQ=10xS.Sapma	0.4882
LOD	0.1465
LOQ (hesaplanan)	0.4882

Geri kazanım çalışmaları için Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde OTA'nın kuru incir için belirlenmiş limiti bulunmamaktadır. Ancak kurutulmuş asma meyveleri için belirlenmiş olan limit 10 µg/kg değeri kriter olarak kabul edilirse, 10 µg/kg düzeyinde okratoksin standardı kontrol örneğine eklenerek okuma yapılmıştır. Geri kazanım değeri; 9.7 µg/kg saptanmış ve geri kazanım yüzdesi %97 olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamında incelenen kuru incir örneklerinin analiz sonuçları SPSS 22 paket programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanılarak %95 güven seviyesinde ($p < 0.05$) varyans analizine tabi tutulmuştur ve Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, önemli bulunan farklılıklar incelenmiştir. Ayrıca, XL-STAT 2019 (Addinsoft, Newyork City, NY, USA) paket programı kullanılarak verilere temel bileşen analizleri uygulanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Kuru incirlerin antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde içeriği

Adana ilinde satış noktalarından alınan 21 farklı kuru incir örneğinin antioksidan kapasitesi ABTS ve DPPH olmak üzere iki farklı yöntemle belirlenmiş ve Tablo 4'de verilmiştir. Kuru incir örnekleri arasında antioksidan içeriği bakımından istatistiksel yönden önemli ($p < 0.05$) farklılıklar olduğu belirlenmiştir. DPPH ve ABTS yöntemlerinde sırasıyla antioksidan kapasite en yüksek T örneğinde 546.7 µmol trolox/100 g kuru madde, 1367.0 µmol trolox/100 g kuru madde ve en düşük C örneğinde 296.2 µmol trolox/100 g kuru madde, 675.7 µmol trolox/100 g olarak saptanmıştır. Tablo 4'te görüldüğü gibi ABTS yönteminde sonuçlar daha yüksek değerlerde çıkmıştır, yapılan araştırmalarda bunun sebebinin, ABTS yönteminde incirin içerdiği hidrofilik antioksidan bileşiklerin daha iyi absorbans vermesinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Cano ve ark., 2002; Opitz ve ark., 2014). Daha önce yapılan çalışmalara göre incirin antioksidan kapasitesi fitokimyasal bileşik miktarıyla yüksek oranda ilişkili olduğu saptanmıştır (Ammar ve ark., 2015; Çalışkan ve Polat, 2011; Faleh ve ark., 2012; Ouchemoukh ve ark., 2012). Kamiloglu ve Çapanoglu (2015), yaptıkları çalışmada kuru incirlerin DPPH yöntemine göre antioksidan kapasitelerini 222-739 mg trolox /100 g kuru madde arasında olduğunu saptamışlardır.

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 4. Örneklerin toplam fenolik madde, antioksidan aktivite sonuçları

Örnek Kodu	DPPH**	ABTS**	Toplam Fenolik Madde***
A	339.4 ± 1.86 ^{bcd}	714.9 ± 5.13 ^{abc}	153.5 ± 1.22 ^{bc}
B	393.5 ± 4.33 ^{efgh}	817.0 ± 4.95 ^{efg}	174.3 ± 1.61 ^{ghi}
C	296.2 ± 0.35 ^a	675.7 ± 0.18 ^a	131.6 ± 2.40 ^a
D	372.7 ± 1.77 ^{defg}	802.3 ± 0.71 ^{def}	171.3 ± 3.17 ^{gh}
E	460.8 ± 1.94 ^{ik}	928.7 ± 0.71 ^{hi}	209.3 ± 3.12 ^j
F	400.4 ± 1.86 ^{fghi}	842.9 ± 2.65 ^{fg}	176.7 ± 2.24 ^{ghi}
G	368.6 ± 0.00 ^{defg}	769.1 ± 2.56 ^{cde}	166.0 ± 1.01 ^{defg}
H	408.5 ± 4.60 ^{ghi}	856.2 ± 0.09 ^{fg}	179.3 ± 1.80 ^{hi}
I	324.7 ± 1.86 ^{abc}	695.3 ± 1.15 ^{ab}	150.8 ± 0.42 ^{bc}
J	355.7 ± 2.47 ^{cde}	759.3 ± 2.56 ^{cde}	157.2 ± 2.07 ^{bcd}
K	308.3 ± 5.83 ^{ab}	686.8 ± 0.44 ^{ab}	147.8 ± 1.40 ^b
L	485.9 ± 2.03 ^{kl}	1259.0 ± 0.35 ^j	258.4 ± 1.50 ^l
M	438.4 ± 6.0 ^{ij}	874.6 ± 3.45 ^{gh}	206.0 ± 2.11 ^j
N	361.8 ± 0.71 ^{cdef}	762.8 ± 0.09 ^{cde}	160.3 ± 1.19 ^{cdef}
O	463.8 ± 1.06 ^{jk}	981.0 ± 0.18 ⁱ	245.4 ± 0.62 ^k
P	521.0 ± 0.53 ^{lm}	1265.1 ± 0.53 ^j	256.6 ± 2.81 ^l
R	343.1 ± 0.53 ^{bcd}	743.8 ± 1.41 ^{bcd}	156.1 ± 2.20 ^{bcd}
S	372.1 ± 0.27 ^{defg}	800.4 ± 2.83 ^{def}	167.2 ± 1.40 ^{efg}
T	546.7 ± 2.65 ^m	1367.0 ± 3.71 ^k	269.6 ± 0.10 ^m
U	423.6 ± 1.15 ^{hij}	861.8 ± 0.62 ^{fg}	184.6 ± 1.91 ⁱ
V	372.4 ± 0.00 ^{defg}	801.8 ± 1.50 ^{def}	169.8 ± 1.59 ^{fgh}

^{a-m} Aynı sütündeki farklı üstel harfler örnekler arasında önemli fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). **µmol trolox/100g kuru madde. *** mg GAE /100 g kuru madde

Kuru incirin fenolik asitler, flavonoidler ve karotenoidler açısından zengin bir kaynak olduğu ve insan sağlığı üzerine olumlu faydaları yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir (Chang ve ark., 2016; Sandhu ve ark., 2023). Yapılan toplam fenolik madde analizinde en yüksek içerik T örneğinde 269,6 mg GAE/100 g kuru madde ve en düşük C örneğinde 131,6 mg GAE/100 g kuru madde olarak saptanmıştır. Antioksidan kapasite analizinde DPPH ve ABTS yöntemleriyle sonuçlanan en yüksek T ve en düşük kapasite C örneğinde tespit edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda kuru incir ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriğini 399,49 mg GAE/100 g kuru ağırlık (Bey ve ark., 2013), 756,6 mg GAE/100 g kuru ağırlık (Debib ve ark., 2014) ve 45,24 mg GAE/100 g kuru ağırlık (Hoxha ve ark., 2015) 644,11 mg GAE/100 g kuru ağırlık (Bey ve Louaileche, 2015) olarak tespit etmişlerdir. Literatürde yapılan çalışmalarda, kuru incirlerin toplam fenolik madde miktarı göz önüne alındığında,

çalışmamızda elde edilen sonuçlarla benzer olduğu görülmektedir.

Şeker bileşimi

Kuru incirlerde sakkaroz, glikoz ve fruktoz bileşikleri belirlenmiştir. Kuru incirlerde baskın şekerin glikoz olduğu tespit edilmiş ve belirlenen sakkaroz, glikoz, fruktoz ve toplam şeker miktarları arasında istatistiksel olarak (p <0.05) önemli farklar saptanmıştır. Örneklerde glikoz ve fruktoz baskın olup G/F oranının yaklaşık 1.5 dolayında olduğu belirlenmiştir. Tablo 5'te görüldüğü gibi 21 adet kuru incir örneğinin glikoz ve sakkaroz miktarları en düşük N örneğinde saptanmış olup sırasıyla bu değerler 378,21 g/kg kuru madde ve 248,94 g/kg kuru madde olarak saptanmıştır. Ayrıca en düşük fruktoz miktarının T örneğinde olduğu tespit edilmiştir. En yüksek toplam şeker miktarı K örneğine ait olup, K örneğinin içerdiği toplam şeker miktarı 863,44 g/kg kuru madde olarak belirlenmiştir. En düşük şeker içeriğine sahip N

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

örneğin şeker içeriği ise 658.63 g/kg kuru madde olarak saptanmıştır.

Tablo 5. Kuru incir örneklerinin şeker bileşimi

Örnek	Sakkaroz	Glikoz	Fruktoz	Toplam Şeker
A	27.66 ± 0.19 ^{bede}	438.70 ± 5.43 ^{bcd}	298.85 ± 0.51 ^{gh}	765.21 ± 6.12 ^{de}
B	28.27 ± 0.01 ^{bede}	433.91 ± 0.63 ^{abcd}	293.58 ± 0.52 ^{defgh}	755.76 ± 1.16 ^{abcd}
C	27.77 ± 0.22 ^{bcd}	422.12 ± 0.00 ^{abc}	294.18 ± 0.00 ^{bcdefg}	744.06 ± 0.22 ^{abcd}
D	29.73 ± 0.06 ^{bede}	462.82 ± 0.08 ^{abcd}	319.82 ± 0.07 ^h	813.24 ± 0.54 ^{de}
E	32.76 ± 0.30 ^{cde}	415.89 ± 0.23 ^{ab}	278.18 ± 0.15 ^{abcde}	726.83 ± 0.37 ^{abc}
F	25.41 ± 0.39 ^{abc}	407.65 ± 0.00 ^{abc}	297.19 ± 0.07 ^{efgh}	730.26 ± 0.32 ^{abcd}
G	25.78 ± 0.25 ^{abc}	402.9 ± 2.65 ^{ab}	273.38 ± 0.18 ^{abcdef}	702.05 ± 2.58 ^{ab}
H	29.46 ± 0.28 ^{cde}	400.38 ± 0.36 ^{abc}	267.84 ± 0.27 ^{abcdef}	697.68 ± 0.35 ^{abcd}
I	25.30 ± 0.27 ^{abc}	434.46 ± 3.13 ^{abcd}	284.46 ± 3.57 ^{defgh}	744.22 ± 6.44 ^{bcd}
J	26.27 ± 0.15 ^{abc}	406.52 ± 0.28 ^{abc}	279.46 ± 0.06 ^{abcdefg}	712.25 ± 0.18 ^{abcd}
K	27.59 ± 0.38 ^{bede}	495.67 ± 1.81 ^f	340.17 ± 1.43 ⁱ	863.44 ± 3.63 ^f
L	31.57 ± 0.25 ^{def}	397.32 ± 4.05 ^{abcd}	289.04 ± 1.30 ^{fgh}	717.93 ± 5.11 ^{bcd}
M	31.59 ± 0.09 ^{ef}	445.7 ± 3.17 ^{cd}	284.80 ± 4.08 ^{cdefgh}	762.09 ± 7.15 ^{cde}
N	19.79 ± 0.22 ^a	378.21 ± 1.65 ^a	260.64 ± 0.36 ^{abcd}	658.63 ± 2.23 ^a
O	20.36 ± 0.67 ^{ab}	393.97 ± 0.84 ^{abc}	253.36 ± 0.49 ^{ab}	667.70 ± 0.66 ^{ab}
P	27.81 ± 0.93 ^{abc}	398.33 ± 0.72 ^{ab}	264.59 ± 0.38 ^{abc}	690.73 ± 0.18 ^{ab}
R	28.3 ± 0.19 ^{abcd}	425.92 ± 0.63 ^{abc}	282.39 ± 0.18 ^{abcdef}	736.61 ± 0.63 ^{abcd}
S	28.07 ± 0.17 ^{abcd}	422.17 ± 0.20 ^{abc}	274.08 ± 0.04 ^{abcde}	724.32 ± 0.00 ^{abcd}
T	24.87 ± 0.11 ^{abc}	391.2 ± 0.00 ^{abc}	248.94 ± 0.00 ^a	665.01 ± 0.11 ^{ab}
U	36.49 ± 0.22 ^f	479.57 ± 2.13 ^{ef}	336.56 ± 1.23 ⁱ	852.63 ± 3.58 ^{ef}
V	31.16 ± 0.12 ^{bede}	429.56 ± 0.41 ^{abc}	272.83 ± 0.25 ^{abcdef}	733.54 ± 0.04 ^{abcd}

^{a-i} Aynı sütundaki farklı üstel harfler örnekler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir (p<0.05). * g/kg kuru madde

Aflatoksin B₁ (AFLB₁) ve Toplam Aflatoksin Miktarları

Kuru incirlerin işlenmesi, depolanması sırasındaki sıcaklık ve nem koşulları, toksijenik küflerin çoğalmasına ve daha fazla mikotoksin üretmelerine sebep olmaktadır. Mikotoksinler, kuru incirlerde hem hasat öncesi hem de hasat sonrası dönemde oluşabilecek en tehlikeli bileşiklerdir ve en sık bulunan mikotoksinler aflatoksinler ve OTA'dır (Bircan, 2009; Drusch ve Aumann 2005). Aflatoksinler, toksijenik *Aspergillus* türlerinden, özellikle *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından üretilen spesifik bir mikotoksin grubudur. Çeşitli aflatoksin türleri bilinmektedir, ancak sadece AFLB₁, AFLB₂, AFLG₁ ve AFLG₂ doğada doğal olarak oluşan formlardır. Bunlar arasında AFLB₁ gıda ürünlerinde en belirgin olanıdır ve diğer üç alfatoksin türü AFLB₁'in yokluğunda genellikle

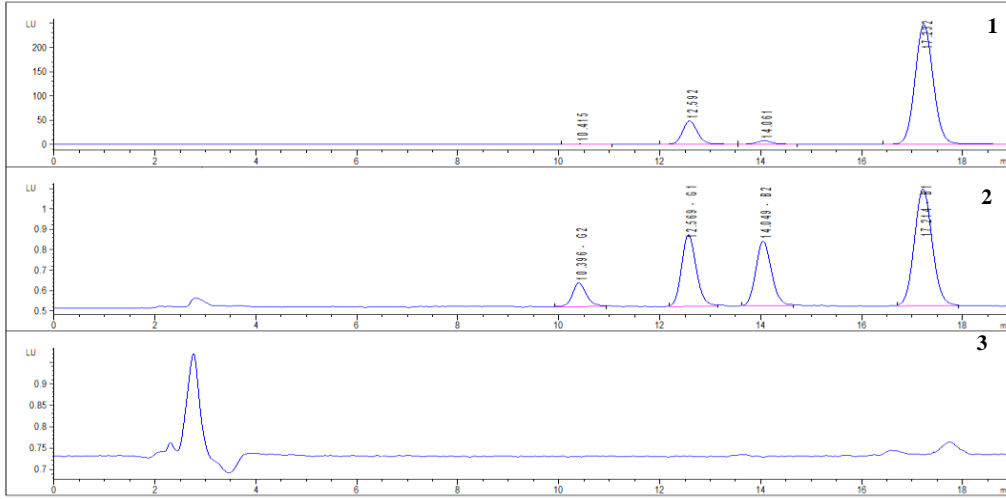
gözlenmemektedir (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi EFSA 2018). Kanserojen, bağışıklık sistemini baskılayıcı, genotoksik ve mutajeniktirler (Khan ve ark., 2021). İnsanların alfatoksinlerle maruz kalmasının zararlı sağlık etkileri, bu toksinlerle kirlenmiş tarım ürünlerinin tüketilmesiyle ilişkili önemli halk sağlığı risklerini oluşturmakta ve insanların ölümüne neden olabilmektedir. Aflatoksinler hem insan sağlığı hem de tarımsal kayıplar açısından büyük önem taşımaktadır. Birçok ülke ve uluslararası kuruluş farklı gıdalar için aflatoksinlerin maksimum seviyelerini belirlemektedir. Türkiye'nin mikotoksinlere ilişkin ulusal mevzuatı AB mevzuatı ile uyumlu hale getirilmiştir (Kabak, 2021).

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamız kapsamında piyasadan sağlanan kuru incirlerde yapılan değerlendirmeler sonucunda, elde edilen sonuçların %90,5 oranı Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde yer alan kuru incirlerde AFLB₁ ve toplam aflatoksin (AFLB₁+AFLB₂+AFLG₁+AFLG₂) limitleri olan 8-10 µg/kg limitini aşmadığı (05 Kasım 2023 tarihli ve 32360 sayılı resmi gazete 'de yayınlanan "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde " 2025 yılında bu limit 6-10 µg/kg olarak belirlenmiştir) ve ilgili yönetmeliğe uygunluğu tespit edilmiştir. Analiz yapılan numunelerin %9,5'inin ise LOQ seviyesini aştığı ve sonuçların geri kazanımlara göre hesaplanmasıyla gıda güvenliği açısından

tüketim limitlerine uymadığı ve risk oluşturma potansiyelinin olduğu görülmüştür.

Tablo 6'da görüldüğü gibi LOQ seviyesini aşan numunelerden P numunesinin AFLB₁ değeri 15.6 µg/kg, T numunesinin AFLB₁ değeri 909.75 µg/kg olarak tespit edilmiş ve ilgili limitlere uygunsuzluğu saptanmıştır. Toplam aflatoksin değerleri incelendiğinde, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde belirtilen limitlere göre P numunesinin maksimum limitten 2 kat fazla, T numunesinin ise yaklaşık 100 kat fazla toksin içerdiği saptanmıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 1'de verilmiştir. Ayrıca Tablo 6'da numunelerde tespit edilen ve ölçüm limitini aşmış P ve T örneklerinin aflatoksin sonuçları verilmiştir.



Şekil 1. AFLB₁ analizi kromatogramlarının karşılaştırılması (1. T örneği, 2. 1 ppb AFLB₁ standardı, 3. Kontrol örneği)

Örneklerin AFLB₁ ve toplam aflatoksin değerleri sırasıyla P örneği için AFLB₁ 16.95 µg/kg, AFLB₂ 1.01 µg/kg, AFLG₁ 14.2 µg/kg, AFLG₂ 0.6 µg/kg, toplam aflatoksin 32.83 µg/kg ve T örneği için AFLB₁ 909.75 µg/kg, AFLB₂ 10.53 µg/kg, AFLG₁ 242.6 µg/kg, AFLG₂ 0.91 µg/kg ve toplam aflatoksin 1163.8 µg/kg olarak belirlenmiştir (Tablo 6).

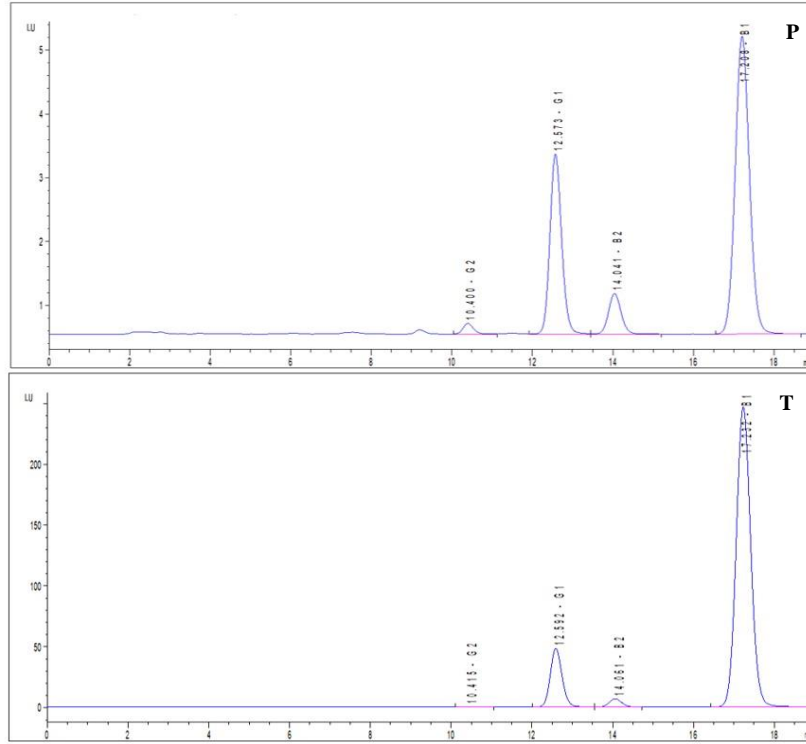
Kuru incirlerde aflatoksinlerin varlığına ilişkin birçok çalışma yapılmıştır. Brezilya'da 19 kuru incir örneği üzerinde yapılan bir çalışmada, dokuz örnekte 0.3–2 µg/kg ve bir örnekte 1500 µg/kg aralığında AFLB₁ tespit edilmiştir

(Iamanaka ve ark., 2007). Şenyuva ve ark., (2007), 2003-2006 yılları arasında ihracata yönelik olarak toplanan kuru incir örneklerinde aflatoksinleri araştırmış ve örneklerin %2.5'inin ve %3.35'inin AFLB₁ ve toplam aflatoksin açısından sırasıyla 2 ve 4 µg/kg sınırını aştığını bildirmiştir.

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Tablo 6. Kuru incir örneklerinde HPLC yöntemi ile aflatoksin bulguları

Örnek	P	T
AFLB ₁ (µg/kg)	16.95 ± 3.65	909.75 ± 191.04
AFLB ₂ (µg/kg)	1.01 ± 0.23	10.53 ± 2.42
AFLG ₁ (µg/kg)	14.2 ± 3.85	242.6 ± 65.5
AFLG ₂ (µg/kg)	0.6 ± 0.23	0.91 ± 0.35
Toplam Aflatoksin (µg/kg)	32.83 ± 5.25	1163.8 ± 201.98



Şekil 2. P ve T örneğine ait aflatoksin kromatogramı

Okratoksin A (OTA) Tayini

Okratoksin A (OTA), esas olarak ılıman iklimlerdeki *Penicillium verrucosum* ve sıcak ve tropik ülkelerdeki *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus carbonarius* tarafından üretilen ve hasattan önce veya depolama sırasında tarım ürünlerini kirletebilen bir böbrek toksini olarak bilinmektedir ve miktarının tespit edilmesi kuru incirlerin ihracatı için oldukça önemlidir. Bu bileşiğin Balkan Endemik Nefropatisi olarak adlandırılan ölümcül insan böbrek hastalığıyla ve üst üriner sistemdeki tümörlerin görülme sıklığında artışla ilişkilendirilmiştir (EFSA, 2006).

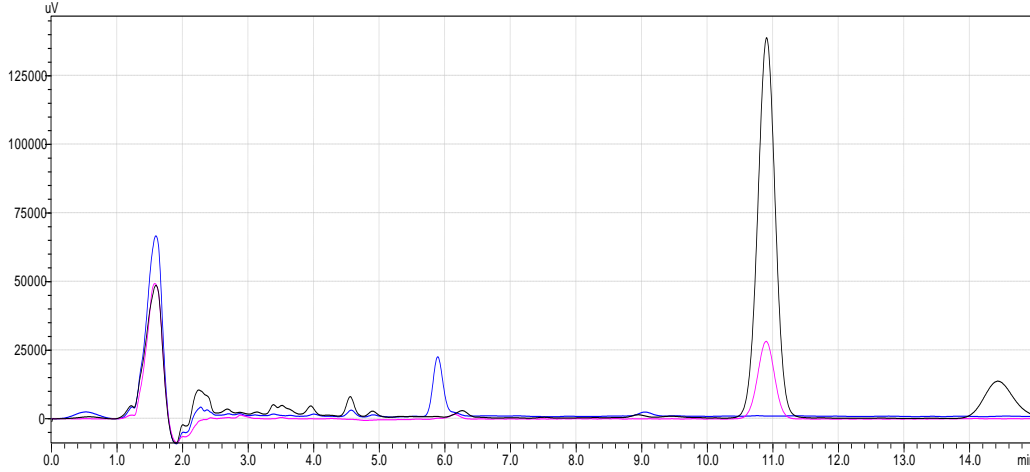
Piyasadan toplanan kuru incir numunelerinin, OTA miktarları değerlendirildiğinde elde edilen sonuçların %76.2 oranında LOQ seviyesini

aşmadığı ve bu numunelerin gıda güvenliği açısından risk teşkil etmediği tespit edilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde OTA'nın kuru incir için belirlenmiş herhangi bir limiti bulunmamaktadır. Bu sebeple kuru incirin OTA analiz sonuçlarının yorumlanabilmesi için 5 Ağustos 2022 tarihli Komisyon Yönetmeliği (AB) 2022/1370 kuru incir meyvelerine belirlenmiş limit olan 8 µg/kg değeri kriter olarak kabul edilmiştir. Bu kritik değere göre T numunesi ilgili limiti yaklaşık 18 kat, B numunesi ilgili limiti 13 kat ve V numunesi ilgili limiti yaklaşık 6 kat aştığı saptanmıştır. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliğinde yer alan kuru meyvelerde OTA maksimum limiti 31.12.2024 itibarıyla 10 µg/kg olarak belirlenmiştir. Kromatogramların

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

karşılaştırılması amacıyla kontrol örneği, 10 ppb OTA standardı ve T örneğinin kromatogramları Şekil 3'de verilmiştir. Ayrıca Tablo 7'de

numunelerde tespit edilen ve ölçüm limitini aşmış numunelerin sonuçları verilmiştir.



Şekil 3. OTA analizi kromatogramlarının karşılaştırılması (Siyah renk: T örneği, pembe renk: 10 ppb OTA standardı, mavi renk: Kontrol)

Örneklerin OTA değerleri sırasıyla B örneği için 109.8 µg/kg, L örneği için 3.1 µg/kg, M örneği için 8.76 µg/kg, T örneği için 154.2 µg/kg ve V örneği için 49.6 µg/kg olduğu saptanmıştır. OTA üretimini etkileyen en önemli faktörler sıcaklık ve su aktivitesidir. İncirlerin hasat edilmesi, kurutulması, kurutma sonrası taşınması ve depolanması sırasında OTA seviyeleri artış

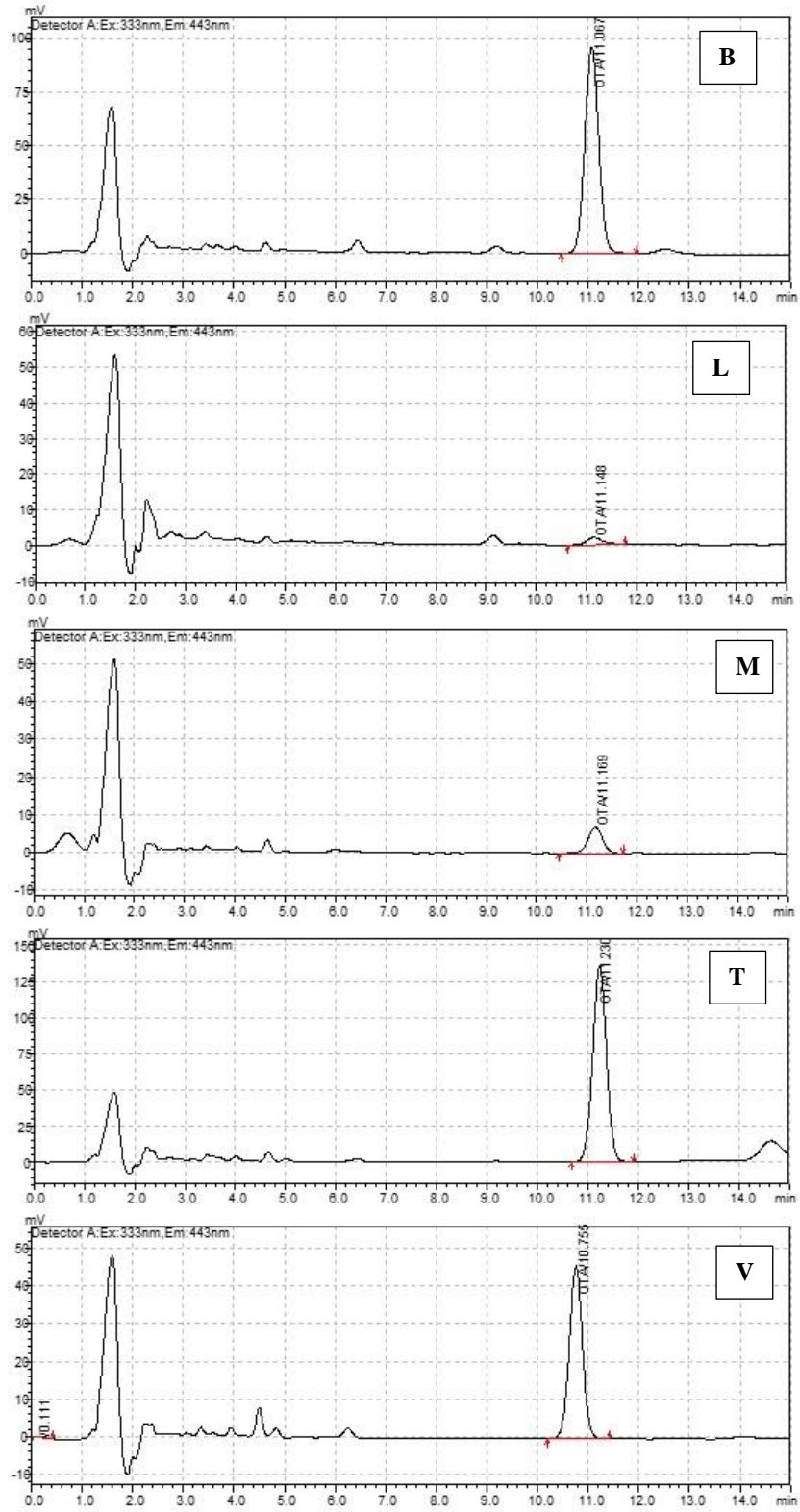
göstermiş olabilir. Daha önce yapılan bir çalışmada, Ege Bölgesinden kurutma aşamasında 115 örnek alınmış ve 115 örneğin 55'inde (%47.2) 0.12 ile 15.31 arasında değişen düzeyde OTA bulunduğunu tespit etmişlerdir (Karbancıoğlu-Güler ve Heperkan 2008).

Tablo 7. Kuru incir örneklerinde HPLC yöntemi ile OTA bulguları

Örnek	B	L	M	T	V
Okratoksin A (OTA) (µg/kg)	109.8 ± 19.76 ^d	3.1 ± 0.56 ^a	8.76 ± 1.57 ^b	154.2 ± 27.76 ^c	49.6 ± 8.92 ^c

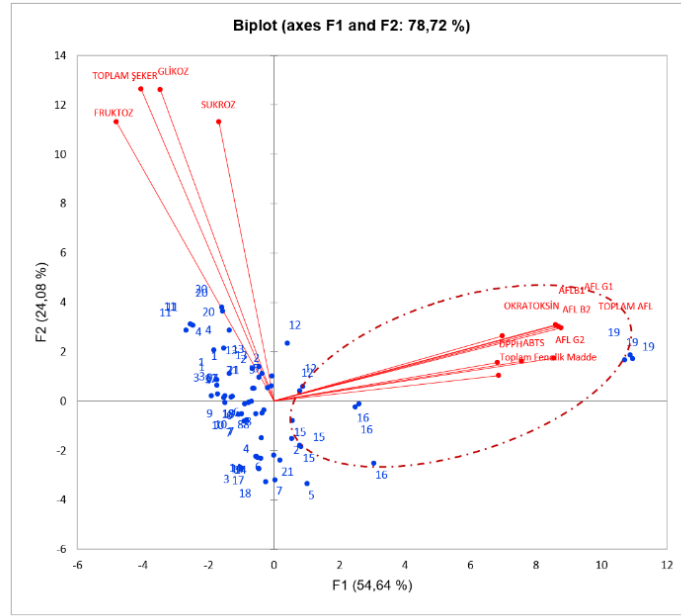
^{a-c} Aynı satırdaki farklı üstel harfler örnekler arasında önemli bir fark olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi



Şekil 4. Örneklerin OTA kromatogramı

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi



Şekil 5. Kuru incirlerin antioksidan aktivite, şeker ve toksin analizlerinin PCA biplotu (1(A), 2(B), 3(C), 4(D), 5(E), 6(F), 7(G), 8(H), 9(I), 10(J), 11(K), 12(L), 13(M), 14(N), 15(O), 16(P), 17(R), 18(S), 19(T), 20(U), 21(V))

Kuru incir örneklerinden elde edilen veriler temel bileşen (PCA) analizlerine tabii tutulmuştur. Kuru incirlerin analizlerinde PCA modeli, toplam varyansın %78,72'sini açıklayan iki temel grup oluşturmuştur (Şekil 5. PC1 %54.64 ve PC2 toplam varyansın %24.08'ini oluşturmuştur). Grafiğin sağ tarafı antioksidan kapasite ve toksin analizlerini ve sol tarafı ise şeker analizlerine ait verileri içermektedir. 12 numaralı L örneği ile 19 numaralı T örneğinin grafiğimizin sağ üst tarafında gruplar oluşturmuştur. Grafikten gözlemlenebileceği gibi L, P ve T örnekleri toksik ve antioksidan yapıları bileşiklerle karakterize edilirken, örneklerimizden A, H, K, L, M, N, U grafiğin sol üst tarafında yer alıp, toplam şeker ve şeker bileşenleri ile karakterize edilir. Özellikle P ve T örnekleri yüksek aflatoksin ve okratoksin içerikleri ile dikkati çekmektedir.

Sonuç

Çalışmamız kapsamında Adana ilindeki toptan ve perakende satış noktalarından sağlanan 21 adet kuru incirlerin şeker bileşimi, antioksidan kapasitesi (DPPH ve ABTS), toplam fenolik madde miktarı, OTA ve aflatoksin analizleri HPLC ile yapılmıştır. Kuru incir örneklerinin %90.5'inin AFLB₁ ve toplam aflatoksin

sonuçlarının Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği limitlerine uygun olduğu belirlenmiştir. Analizi yapılan iki örnekte aflatoksin miktarlarının tüketim limitlerine uymadığına tespit edilmiştir. Özellikle P ve T örneklerindeki AFLB₁ miktarları, yasal limitlere kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu, T örneğinin ise insan sağlığına toksik etki gösteren bir numune olarak öne çıktığı saptanmıştır. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde belirlenmiş bir limit olmamasına rağmen, OTA analizleri yapılmış ve örneklerin çoğunluğunun belirlenen LOQ seviyelerini aşmadığı belirlenmiştir. Ancak, özellikle T örneği OTA miktarı açısından önemli bir risk teşkil etmektedir. Şeker içeriği analizleri, özellikle glikozun en baskın şeker olduğunu ve T örneğinin en yüksek toplam şeker miktarına sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde analizleri, T örneğinin bu açılardan da en yüksek değerlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Kuru incirlerin üretiminden tüketimine kadar olan süreçte güvenilirliğinin sağlanması, iç piyasa ve ihracat aşamalarının sık sık denetlenmesi ve toksin analizlerinin düzenli olarak gerçekleştirilmesi büyük bir öneme sahiptir.

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Teşekkür

Bu çalışma Adana Alparslan Türkeş Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje Numarası: 21303018) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A. S., Pereira, M., & Venâncio, A. (2016). A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(2), 249–265. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.720619>
- Afsah-Hejri, L., Jinap, S., Hajeb, P., Radu, S., & Shakibazadeh, S. (2013). A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 12: 629–651.
- Aksoy U., Can H.Z., Hepaksoy S., Sahin N. (2001). Fig cultivation. TARP Turkey Agricultural Research Project Press, Izmir, Turkey.
- Aksoy, U. (2017). The dried fig management and the potential for new products. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1173.65>.
- Ammar, S., del Mar Contreras, M., Belguith-Hadrich, O., Segura-Carretero, A., & Bouaziz, M. (2015). Assessment of the distribution of phenolic compounds and contribution to the antioxidant activity in Tunisian fig leaves, fruits, skins, and pulps using mass spectrometry-based analysis. *Food & function*, 6(12), 3663–3677.
- Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), (2006). Opinion of the scientific panel on the contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. Question No EFSA-Q-2005–154. *EFSA J.* 365, 1–56.
- Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., ... & Petersen, A. (2018). Effect on public health of a possible increase of the maximum level for 'aflatoxin total' from 4 to 10 µg/kg in peanuts and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs. *EFSA Journal*, 16(2), e05175.
- Bey, M. B., & Louaileche, H. (2015). A comparative study of phytochemical profile and in vitro antioxidant activities of dark and light dried fig (*Ficus carica* L.) varieties. *The Journal of Phytopharmacology*, 4(1), 41-48.
- Bey, M. B., Louaileche, H., & Zemouri, S. (2013). Optimization of phenolic compound recovery and antioxidant activity of light and dark dried fig (*Ficus carica* L.) varieties. *Food Science and Biotechnology*, 22, 1613-1619.
- Bircan, C. (2009). Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. *Food and Chemical Toxicology*, 47(8), 1996-2001.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Çalışkan, O., & Polat, A. A. (2011). Phytochemical and antioxidant properties of selected fig (*Ficus carica* L.) accessions from the eastern Mediterranean region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 128(4), 473-478.
- Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., & Arnao, M. B. (2002). On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS*+ assay. *Redox report : communications in free radical research*, 7(2), 103–109. <https://doi.org/10.1179/135100002125000334>
- Chang, S. K., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2016). Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *Journal of functional foods*, 21, 113-132.
- Debib, A., Tir-Touil, A., Mothana, R. A., Meddah, B., & Sonnet, P. (2014). Phenolic Content, Antioxidant and

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

- Antimicrobial Activities of Two Fruit Varieties of A Algerian *Ficus carica* L. *Journal of food biochemistry*, 38(2), 207-215.
- Desa, W. N. M., Mohammad, M., & Fudholi, A. (2019). Review of drying technology of fig. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 93-103.
- Di Sanzo, R., Carabetta, S., Campone, L., Bonavita, S., Iaria, D., Fuda, S., & Russo, M. (2018). Assessment of mycotoxins co-occurrence in Italian dried figs and in dried figs-based products. *Journal of Food Safety*, 38(6), e12536.
- Drusch, S., & Aumann, J. (2005). Mycotoxins in fruits: Microbiology, occurrence, and changes during fruit processing. *Advances in food and nutrition research*, 50, 33-78.
- Ersoy, N., Gozlekci, S., Gok, V., & Yilmaz, S. (2017). Fig (*Ficus carica* L.) fruit : Some Physical and Chemical Properties. *Acta Horticulturae*. 329–334.
- Faleh, E., Oliveira, A. P., Valentão, P., Ferchichi, A., Silva, B. M., & Andrade, P. B. (2012). Influence of Tunisian *Ficus carica* fruit variability in phenolic profiles and in vitro radical scavenging potential. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 1282-1289.
- Food and Agricultural Organization (FAO), 2021. FAO Statistical Databases and Datasets. Available from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> L (cited 2021 Dec 20)
- Gilbert, J., & Senyuva, H. (2008). Fungal and mycotoxin contamination of dried figs-a review. *JSM Mycotoxins*, 58(2), 73-82.
- Hajam, T. A., & Saleem, H. (2022). Phytochemistry, biological activities, industrial and traditional uses of fig (*Ficus carica*): A review. *Chemico-Biological Interactions*, 110237.
- Heperkan, D., Moretti, A., Dikmen, C. D., & Logrieco, A. F. (2012). Toxigenic fungi and mycotoxin associated with figs in the Mediterranean area. *Phytopathologia Mediterranea*, 119-130.
- Hoxha, L., Kongoli, R., & Hoxha, M. (2015). Antioxidant activity of some dried autochthonous Albanian fig (*Ficus carica*) cultivars. *International Journal of Crop Science and Technology*, 1(2), 20-26.
- Iamanaka, B. T., de Menezes, H. C., Vicente, E., Leite, R. S., & Taniwaki, M. H. (2007). Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food control*, 18(5), 454-457.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), (2016). Agents classified by the IARC Monographs, Volumes 1–116. Retrieved from <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>. Accessed October 25, 2016
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2006). Preamble to the IARC Monographs. Scientific Review and Evaluation. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/currentbscientificintro0706.php>. Published.
- International Nut and Dried Fruit Council (INC), 2021. INC statistics. Available from <https://www.nutfruit.org/industry/statistics> (cited 2021, Dec 22).
- International Organization for Standardization. ISO 11843–2 Capability of Detection. ISO Copyright office; Geneva, Switzerland: 2000.
- Kabak, B. (2021). Aflatoxins in foodstuffs: Occurrence and risk assessment in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103734.
- Kamiloglu, S., & Capanoglu, E. (2015). Polyphenol content in figs (*Ficus carica* L.): Effect of sun-drying. *International Journal of Food Properties*, 18(3), 521-535.
- Karbancıoğlu-Güler, F., & Heperkan, D. (2008). Natural occurrence of ochratoxin A in dried figs. *Analytica chimica acta*, 617(1-2), 32–36.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroğlu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187-192.

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

- Kelebek, H., Selli, S., Kadiroğlu, P., Kola, O., Kesen, S., Uçar, B., & Çetiner, B. (2017). Bioactive compounds and antioxidant potential in tomato pastes as affected by hot and cold break process. *Food Chemistry*, 220, 31-41.
- Khan R, Ghazali F.M., Mahyudin N.A., Samsudin NIP. (2021). Aflatoxin Biosynthesis, Genetic Regulation, Toxicity, and Control Strategies: A Review. *Journal of Fungi.*; 7(8):606.
- Lee, H. S., & Coates, G. A. (2000). Quantitative study of free sugars and myo-inositol in citrus juices by HPLC and a literature compilation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23, 2123- 2141.
- Morovati, M. R., Ghanbari-Movahed, M., Barton, E. M., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2022). A systematic review on potential anticancer activities of *Ficus carica* L. with focus on cellular and molecular mechanisms. *Phytomedicine*, 154333.
- Opitz, S. E. W., Smrke, S., Goodman, B. A., & Yeretian, C. (2014). Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*, 253–264. doi:10.1016/b978-0-12-404738-9.00026-x
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, 33, 65-73.
- Ouchemoukh, S., Hachoud, S., Boudraham, H., Mokrani, A., & Louaileche, H. (2012). Antioxidant activities of some dried fruits consumed in Algeria. *LWT-Food Science and Technology*, 49(2), 329-332.
- Sandhu, A. K., Islam, M., Edirisinghe, I., & Burton-Freeman, B. (2023). Phytochemical Composition and Health Benefits of Figs (Fresh and Dried): A Review of Literature from 2000 to 2022. *Nutrients*, 15(11), 2623. <https://doi.org/10.3390/nu15112>
- Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A. G., Korver, O., Smit, F., Walker, R., & Natural Toxin Task Force of the European Branch of the International Life Sciences Institute (2003). *Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 41(12), 1625–1649.
- Şen, F., Aksoy, U., Özer, K. B., Can, H. Z., Köseoğlu, İ., & Konak, R. (2017). Impact of yearly conditions on major physical and chemical properties of fresh, semi-dried and sun-dried fig (*Ficus carica* L. 'Sarılöp') fruit. *Acta Horticulturae*, (1173), 309–314. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1173.53>.
- Senyuva, H. Z., Gilbert, J., & Ulken, U. (2007). Aflatoxins in Turkish dried figs intended for export to the European Union. *Journal of food protection*, 70(4), 1029-1032.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Shephard, G. S. (2008). Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and contaminants*, 25(2), 146-151.
- Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U. & Gilbert, J. (2000). Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 83(2), 320-340
- Sulyok, M., Krska, R., & Senyuva, H. (2020). Profiles of fungal metabolites including regulated mycotoxins in individual dried Turkish figs by LC-MS/MS. *Mycotoxin Research*, 36(4), 381-387.
- Trucksess, M. W., & Scott, P. M. (2008). *Mycotoxins in botanicals and dried fruits:*

Kuru İncirlerin Biyoaktif Özellikleri, Aflatoksin ve Okratoksin A Düzeylerinin Değerlendirilmesi

- a review. *Food Additives and Contaminants*, 25(2), 181-192.
- Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. 5 Kasım 2023 tarih ve 32360 sayılı Resmî Gazete, Ankara.
- Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2016). Phytochemical composition of common fig (*Ficus carica* L.) cultivars. In *Nutritional composition of fruit cultivars* (pp. 235-255). Academic Press.
- Yang, Q., Liu, Y., Guo, Y., Jiang, Y., Wen, L., & Yang, B. (2023). New insights of fig (*Ficus carica* L.) as a potential function food. *Trends in Food Science & Technology*, 104146.



Research Article

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

Sertaç ÖZBAY¹, Musab Abdulkadir ISAK¹, Özhan ŞİMŞEK^{2*}

ABSTRACT

This comprehensive study delves into synthetic seed production and cryopreservation for *Myrtus communis* L., presenting a novel approach to conserving plant genetic resources. Our research highlights shoot tips' encapsulation and subsequent conversion into plants following short-term (+4°C) and long-term (-196°C) preservation periods. The study rigorously compares the viability and efficiency of these cryopreserved seeds with conventional propagation methods. We extensively investigated various factors affecting the success of synthetic seed production, including explant selection, medium composition, and encapsulation techniques. Additionally, the impact of different preservation temperatures on synthetic seeds' viability and germination rates was a focal point. Our results demonstrate a significantly high conversion rate of synthetic seeds to plants post-cryopreservation, indicating the reliability of this method in germplasm conservation. The findings of this research are pivotal for conserving *Myrtus communis* L. genotypes and offer valuable insights and methodologies applicable to other plant species. This study marks a critical advancement in plant biotechnology and germplasm conservation, providing a sustainable solution for preserving valuable genetic resources in the face of escalating environmental challenges.

Keywords: Cryopreservation, Genetic Conservation, Myrtle, Plant Biotechnology, Synthetic Seeds²

Mersin (*Myrtus communis* L.) Genotipleri İçin Sentetik Tohum Üretimi ve Kriyoprezervasyon

ÖZ

Bu kapsamlı çalışma, *Myrtus communis* L. için sentetik tohum üretimi ve kriyoprezervasyon alanına derinlemesine bir bakış sunmakta ve bitki genetik kaynaklarının korunmasına yönelik yenilikçi bir yaklaşımı ortaya koymaktadır. Araştırmamız, sürgün uçlarının kapsülasyonunu ve kısa süreli (+4°C) ve uzun süreli (-196°C) koruma sürelerinin ardından bitkilere dönüşümünü vurgulamaktadır. Çalışma, kriyoprezerve edilmiş tohumların canlılığını ve verimliliğini geleneksel üretim yöntemleriyle karşılaştırmaktadır. Sentetik tohum üretiminin başarısını etkileyen çeşitli faktörler, özellikle eksplant seçimi, ortam bileşimi ve kapsülleme teknikleri üzerinde kapsamlı bir inceleme yapılmıştır. Ayrıca, farklı koruma sıcaklıklarının sentetik tohumların canlılık ve çimlenme oranları üzerindeki etkisi de çalışmanın odak noktalarından biri olmuştur. Sonuçlarımız, sentetik tohumların kriyoprezervasyondan sonra bitkilere yüksek oranda dönüşüm gösterdiğini, bu yöntemin tohum gen kaynaklarının korunmasındaki güvenilirliğini göstermektedir. Bu araştırmanın bulguları, *Myrtus communis* L. genotiplerinin korunması için hayati öneme sahip olup, diğer bitki türleri için de değerli içgörüler ve metodolojiler sunmaktadır. Bu çalışma, bitki biyoteknolojisi ve gen kaynaklarının korunması alanında kritik bir ilerleme olarak, artan çevresel zorluklar karşısında değerli genetik kaynakları korumanın sürdürülebilir bir çözümünü sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kriyoprezervasyon, Genetik Koruma, Mersin, Bitki Biyoteknolojisi, Sentetik Tohumlar

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0009-0000-6401-6616, 0000-0002-5711-0118, 0000-0001-5552-095X

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 16.03.2024

Kabul Tarihi: 11.05.2024

¹Erciyes Üniversitesi

² Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü

*E-posta: ozhan12@gmail.com

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

Introduction

Myrtle, also known as *Myrtus communis* L., is a characteristic plant of the Mediterranean region, comprising perennial, evergreen shrubs, or small trees. Myrtle is a member of the Myrtaceae family, which naturally grows in tropical and subtropical regions and includes about 100 genera and 3000 species (Rezaee and Kamali, 2014; Şimşek et al. 2023). Various parts of the myrtle plant (leaves, flowers, fruits) contain important components for the medical, food, liquor, and cosmetic industries, making it valuable for anti-genotoxic, anti-mutagenic, antiseptic, and anti-inflammatory purposes, as well as for treating internal and tropical infections (Serce et al., 2008). Myrtle essential oils are useful in pharmaceutical production, and its leaves can be consumed as tea (Flamini et al. 2004; Şimşek et al. 2022). Myrtle plants, ranging from 0.5 to 3 meters in height, are slow growing but long-lived, always remaining green as they do not shed their leaves in winter (Picci and Atzei, 1996). The leaves have an aromatic scent, and its fruits, typically blackish-purple or white, mature in late autumn (October-December), are edible, and have a sweet and astringent taste (Sumbul et al., 2011; Aleksic & Knezevic, 2014). The fruit is pollinated by insects and covered with a slight waxy layer, which helps bees recognize the plant. This multi-seeded fruit contains volatile oils, tannins, sugars, and organic acids (citric and malic acid). Myrtle leaves are rich in phenolic acids like caffeic, ellagic, and gallic acids and quercetin, catechin, and myricetin derivatives (Simsek et al., 2020).

Myrtle can be propagated through seeds, cuttings, and *in vitro* techniques. The totipotency of plant tissues - the ability to differentiate and form a new plant - is a significant feature in plant tissue culture, enabling rapid clonal propagation and the cultivation of disease-free plants. This method is increasingly important for conserving Plant genetic resources through *in situ* (natural habitat) or *ex situ* (outside natural habitat) methods (Grzegorzczuk and Wysokińska 2011). The concept of a "Gene Center" or "Center of Origin", where plants first appeared and evolved, is crucial in botany. Russian botanist Vavilov

identified 8 such Gene Centers worldwide, with Turkey being significant within the Near East and Mediterranean basin (Tan, 1998). The conservation of plant biological diversity, known as "genetic erosion," is critical for protecting endangered plant species, forms, and varieties. Although *in vitro* conservation methods offer short-term storage, they are economically inefficient, require extensive space, and are prone to contamination and somaclonal variation. Cryopreservation, developed in the late 1900s, involving ultra-low temperatures (-196 °C) in liquid nitrogen, provides a suitable method for long-term germplasm conservation. It slows down biological materials, making it applicable to various plant tissues and organs (Towill and Bajaj, 2002; Lambardi and De Carlo, 2003).

Recent advancements in cryopreservation have led to more straightforward, cost-effective techniques, such as one-step freezing based on vitrification, where cell vitrification prevents harmful intracellular ice formation by transforming the cytosol into a glassy, amorphous state (Engelmann, 2004). Vitrification can be chemically induced with high concentration cryoprotectants like PVS2 or physically through desiccation methods, followed by direct transfer to liquid nitrogen. After an hour in liquid nitrogen, samples are quickly thawed in a pre-heated water bath and transferred to a regeneration medium under standard culture conditions (Sakai et al., 1990).

This study explores the *in vitro* conservation possibilities for *M. communis* from selected genotypes in the Adana and Mersin regions, Türkiye, known for their superior characteristics. It evaluates the benefits of synthetic seed technology for micropropagation and short-term conservation of myrtle genotypes and examines the efficacy of cryopreservation for long-term conservation. The primary goal is to develop strategies for conserving the genetic resources of the myrtle plant. This includes bringing shoot tips of myrtle genotypes to the laboratory, sterilizing them, converting them into synthetic seeds with Na-alginate coating, and subjecting them to short-term conservation at +4°C for 45

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

days or long-term conservation via cryopreservation. The study aims to provide an innovative and effective strategy for conserving the genetic diversity of the myrtle plant. It demonstrates the potential of synthetic seed technology and cryopreservation as tools for sustainable conservation and transmission of myrtle plant genetic resources to future generations.

Material and Methods

Plant Material

This study used two genotypes of myrtle from Tarsus/Mersin, Türkiye, one bearing white and the other black fruits. The plant materials were obtained in September 2022. These particular genotypes were chosen for their visually apparent high yield, large fruit size, and robust and healthy plant structure.

Method

Sterilization of Shoot Tips

The shoot tips from the genotypes used in the study were obtained and brought to the laboratory. Before culture initiation, the shoot tips were sterilized. To this end, the shoot tips were first washed under tap water for 10 minutes. In a sterile cabinet, the shoot tips were immersed in 70% ethyl alcohol for 3-4 minutes, followed by a rinse with sterile distilled water. Subsequently, they were treated with a 20% sodium hypochlorite solution for 15 minutes. The shoot tips were rinsed three times with sterile distilled water inside the sterile cabinet to remove the sterilant.

Culture Medium and Establishment of Micropropagation

After sterilization, the shoot tips were placed in MS (Murashige and Skoog, 1962) nutrient medium containing 1mg/L BAP (Benzyl Amino Purine), 30 g/l sucrose, and 7.5 g/l agar. The pH of the nutrient medium was adjusted to 5.7, and then the medium was poured into culture short-term conservation of the resulting synthetic seeds was investigated. (3) The third group of synthetic seeds was used in

containers and sterilized in an autoclave at 121 °C and 1.05 atm pressure. The sterilized nutrient medium was then transferred to a sterile cabinet, and the shoot tips were introduced. The shoots were cultured under 16 hours light, 8 hours dark, and at a temperature of 25 °C.

Development of Encapsulation (Synthetic Seed) Protocol for Shoot Tips and Calculation of Plant Conversion Rates

Shoot tips from two different myrtle genotypes were encapsulated. The shoot tips were first washed in a liquid MS medium without calcium. The structures were transferred to a 3% Na-alginate solution and left in a sterile cabinet at 25°C for 30 minutes. Using a sterile pipette tip cut to 0.5-1 cm, the explants with Na-alginate solution were then transferred into a 100 mM CaCl₂ solution (shaking was performed to prevent synthetic seeds from sticking to each other), facilitating the polymerization of the synthetic seeds (20 minutes at 25°C). The polymerized synthetic seeds were then divided into three groups. The first group of synthetic seeds and uncoated shoot tips were transferred to MS (Murashige and Skoog, 1962) media containing 1 mg/L BAP, and the plant conversion rate was determined after 4 weeks. Additionally, the second group of synthetic seeds was stored in sterile jars at +4 °C for 45 days. Afterward, these synthetic seeds were transferred to MS nutrient media containing 1 mg/L BAP to understand the plant conversion rate after 45 days, which was also determined after 4 weeks. Thus, (1) The plant conversion rate of encapsulated synthetic seeds and uncoated shoot tips from myrtle genotypes bearing white and black fruits was calculated as a percentage. (2) The encapsulated synthetic seeds of shoot tips from myrtle genotypes with white and black fruits were stored at +4 °C for 45 days, and the plant conversion rates of these synthetic seeds were calculated as a percentage after 45 days. The potential for cryopreservation studies to explore the possibilities for long-term conservation of these synthetic seeds.

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

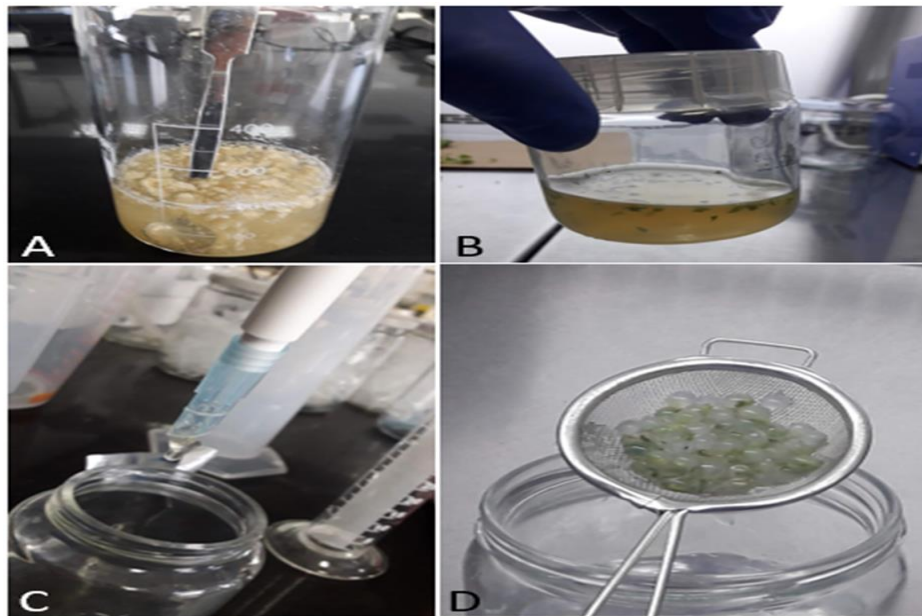


Figure 1. Synthetic Seeds A: Preparation of the Na-Alginate solution. B: Immersion of shoot tips in the sodium alginate solution. C: Coating of shoot tips using a cut pipette tip as a result of polymerization. D: The resulting synthetic seeds.

Cryopreservation Studies

The cryopreservation possibilities for long-term conservation of synthetic seeds obtained by encapsulating shoot tips of *M. communis* genotypes were investigated by freezing them in liquid nitrogen ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Before transferring the synthetic seeds into liquid nitrogen, they were subjected to various solutions per the protocol outlined below to prevent cell damage. The thawing processes were carried out after spending at least one hour in liquid nitrogen. Following the thawing, the synthetic seeds were transferred to MS nutrient media containing 1 mg/L BAP, and the plant conversion rate was determined after 4 weeks.

The cryopreservation study followed a detailed protocol for encapsulation of the synthetic seeds obtained from *M. communis* genotypes' shoot tips. Initially, pre-culture treatments were conducted using MS basal nutrient medium with 2% Mannitol, devoid of hormones, and the explants were kept at $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in darkness for 48 hours. Post-pre-culture, the explants were transferred to cryotubes, and 1.5 ml of loading solution (comprising 2 M glycerol (w/v) and 0.4 M sucrose (w/v)) was added. These were then incubated for 30 minutes at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Following

this, the Loading solution was removed, and the explants were treated with 1.5 ml of PVS-2 solution (Plant Vitrification Solution-2 containing 30% glycerol (w/v), 15% ethylene glycol (w/v), 15% DMSO (w/v), and 0.4 M sucrose (w/v)). This step involved incubation in PVS-2 for 60 minutes at $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. After this period, the PVS-2 solution was replaced with a fresh 1 ml solution. Subsequently, the cryotubes containing PVS-2 were rapidly immersed in a liquid nitrogen tank at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ and maintained there for at least one hour. After this duration, the cryotubes were removed from the nitrogen tank and quickly thawed in a $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath for 2-3 minutes. The PVS-2 solution was then carefully removed from the thawed cryotubes using a sterile syringe, and 1.5 ml of washing solution (Liquid MS basal plus 1.2 M sucrose) was added, followed by an additional incubation period of 20 minutes at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finally, after removing the washing solution, the synthetic seeds from the cryotubes were placed into regeneration media (MS medium containing 1 mg/L BAP) with filter paper. The conversion rate of these synthetic seeds into plants was evaluated after 4 weeks, with the results expressed as a percentage.

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

Experimental Design, Evaluated Criteria, and Statistical Analyses

The study used three replicates, each consisting of 50 shoot tips (encapsulated, unencapsulated, encapsulated, and stored at +4 °C for 45 days, and encapsulated for cryopreservation, totaling 200 shoot tips for each genotype). The plant conversion rates of the shoot tips were calculated as percentages following all treatments. The statistical significance of the differences between the specified treatments was determined using the T-test. Statistical analyses were conducted using the JMP software package. The treatments compared were as follows: (1) The plant conversion rates (%) for both myrtle genotypes using Na-Alginate encapsulated synthetic seeds compared to unencapsulated shoot tips. (2) The plant conversion rates (%) for both myrtle genotypes using Na-Alginate encapsulated synthetic seeds stored at +4 °C for 45 days compared to unencapsulated shoot tips in the first group. (3) The plant conversion rates (%) for both myrtle genotypes using Na-Alginate encapsulated and cryopreserved synthetic seeds compared to unencapsulated shoot tips in the first group.

Results and Discussion

Plant Conversion Rates of Genotypes

The study used two myrtle genotypes, one with white and the other with black fruits. These genotypes are considered significant plant genetic resources in our country and have many applications. In this context, shoot tips from these myrtle genotypes were encapsulated to produce synthetic seeds. The plant conversion rates (%) of encapsulated synthetic seeds and unencapsulated shoot tips were calculated. Part of the encapsulated shoot tips was stored for short-term preservation at +4 °C for 45 days, while another group of synthetic seeds underwent cryopreservation studies. Consequently, biotechnological methods were explored to devise optimum conservation strategies for our plant genetic resources, which are at risk of loss due to various threats. Initially, the plant conversion rates (%) of both myrtle genotypes using Na-Alginate encapsulated synthetic seeds compared to unencapsulated shoot tips were calculated without any storage or treatment, and the data are presented in Figure 2.

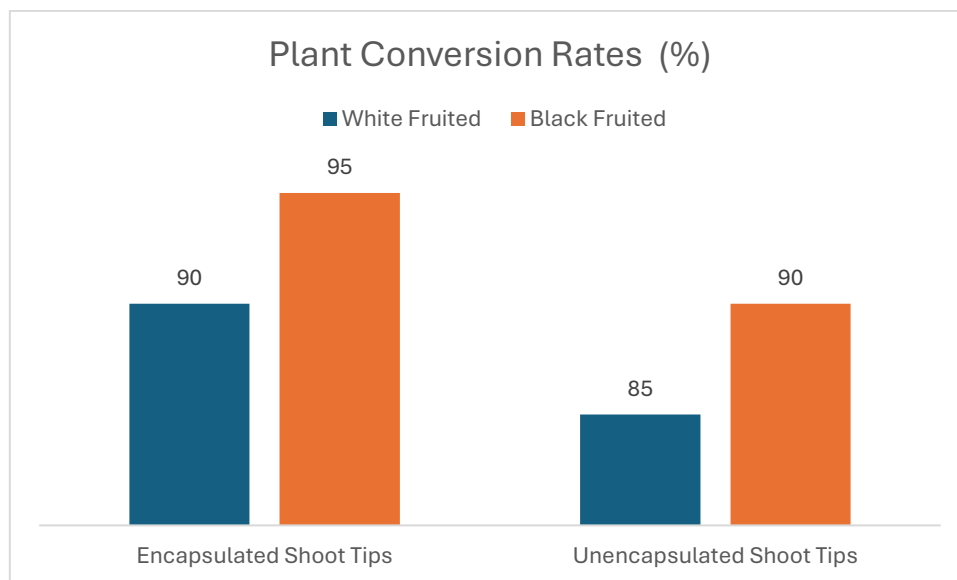


Figure 2. Regeneration rates (%) of coated synthetic seed with Na-Alginate and uncoated shoot tips into plants in both myrtle genotypes.

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

The plant conversion rates were calculated 4 weeks after the shoot tips of myrtle genotypes, and the resulting encapsulated synthetic seeds were cultured in an MS nutrient medium. For the white-fruited myrtle genotype, the plant conversion rate of unencapsulated shoot tips was determined to be 95%. The plant conversion rate for synthetic seeds was identified as 90%. A T-test conducted between the plant conversion rates of shoot tips and synthetic seeds of the white-fruited myrtle genotype showed no significant statistical difference, demonstrating that the encapsulation process did not adversely affect the plant conversion rate of the synthetic seeds. In the case of the black-fruited myrtle genotype, the plant conversion rate of

unencapsulated shoot tips was determined to be 90%, while the conversion rate for synthetic seeds was 85%. A T-test between the plant conversion rates of the black-fruited myrtle genotype's shoot tips and synthetic seeds also showed no significant statistical difference. The plant conversion rate of shoot tips of the white-fruited myrtle genotype was higher than that of the black-fruited genotype.

Additionally, the plant conversion rates (%) of both myrtle genotypes using unencapsulated shoot tips and Na-Alginate encapsulated synthetic seeds stored at +4 °C for 45 days were calculated, and the data are presented in Figure 3.

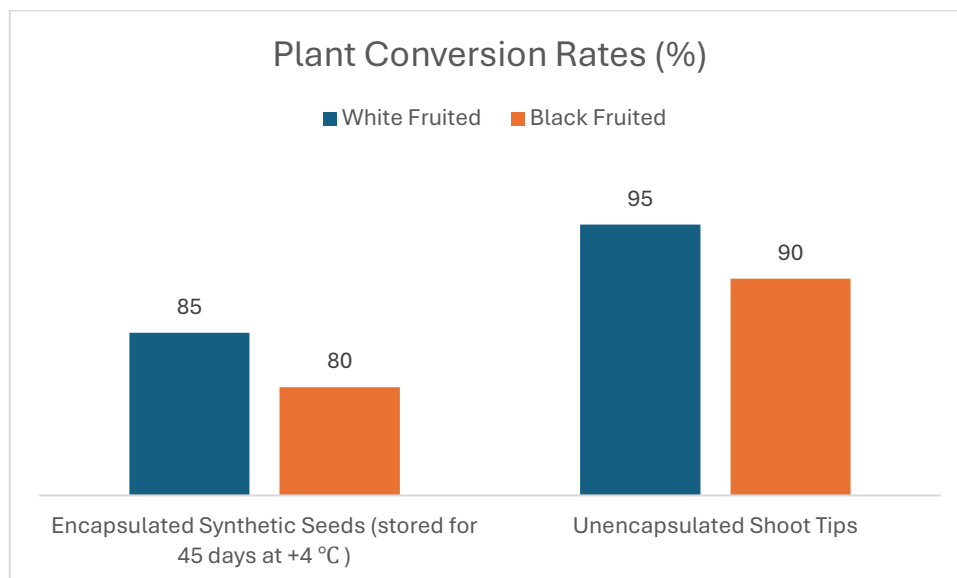


Figure 3. Regeneration rates (%) of Na-Alginate-coated synthetic seeds and uncoated shoot tips of both myrtle genotypes after 45 days at +4 °C.

The synthetic seeds obtained from the encapsulation of shoot tips from myrtle genotypes were stored for 45 days at +4 °C and then cultured in an MS nutrient medium. Four weeks after the initiation of cultivation, the plant conversion rates were calculated as percentages. The data for unencapsulated shoot tips were commonly used for each application. For the white-fruited myrtle genotype, the plant conversion rate of unencapsulated shoot tips was determined to be 95%. The plant conversion rate for synthetic seeds stored at +4 °C for 45 days was 85%. A T-test between the plant conversion

rates of shoot tips and stored synthetic seeds for the white-fruited myrtle genotype indicated a higher success rate for unencapsulated shoot tips. However, a conversion rate of 85% after a 45-day storage period is considered a highly successful result, proving that synthetic seeds obtained by encapsulation can be stored at +4 °C for at least 45 days before being converted into plants. In the black-fruited myrtle genotype, the plant conversion rate for unencapsulated shoot tips was 90%, while the conversion rate for synthetic seeds stored for the same duration was 80%. A T-test comparing these rates showed a

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

higher success rate for unencapsulated shoot tips. Nevertheless, similar to the white-fruited genotype, an 80% conversion rate after a 45-day storage period is highly successful. The plant conversion rate of shoot tips of the white-fruited myrtle genotype was found to be higher than that of the black-fruited genotype. Furthermore, the

plant conversion rates (%) for both myrtle genotypes using cryopreserved Na-Alginate encapsulated synthetic seeds compared to unencapsulated and non-cryopreserved shoot tips were calculated, with the data presented in Figure 4.

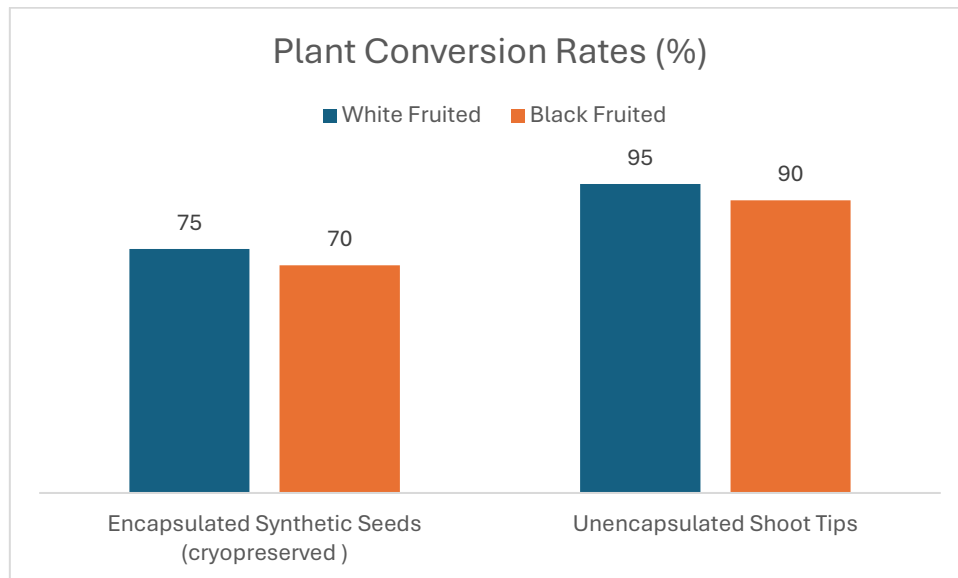


Figure 4. Plant regeneration rates (%) of cryopreserved Na-Alginate-coated synthetic seeds and uncoated and cryopreserved shoot tips in both myrtle genotypes.

In a study on the myrtle genotypes, synthetic seeds derived from encapsulated shoot tips were subjected to cryopreservation and subsequently cultured in the Murashige and Skoog (MS) medium. After four weeks, the conversion rates to plants were calculated as percentages. Data from unencapsulated shoot tips were consistently used across all treatments. In the case of the white-fruited myrtle genotype, the conversion rate of unencapsulated shoot tips to plants was determined to be 95%. For synthetic seeds that underwent cryopreservation, the conversion rate to plants was observed to be 75%. A T-test conducted between the shoot tips of the white-fruited myrtle genotype and the cryopreserved synthetic seeds revealed that the unencapsulated shoot tips had a more successful plant conversion rate. However, the 75% conversion rate observed under preservation conditions at -196°C was also highly successful. This outcome demonstrates that synthetic seeds obtained through encapsulation can be preserved

for desired durations via cryopreservation and converted into plants. In the black-fruited myrtle genotype, the plant conversion rate of unencapsulated shoot tips was identified as 90%. The conversion rate for cryopreserved synthetic seeds in this genotype was 70%. A T-test between the shoot tips and cryopreserved synthetic seeds of the black-fruited myrtle genotype indicated that the unencapsulated shoot tips displayed a more successful conversion rate. Nevertheless, similar to the white-fruited myrtle, the 70% conversion rate post-cryopreservation was deemed a highly successful result, affirming that synthetic seeds can be preserved for extended periods through cryopreservation. Overall, the shoot tips of the white-fruited myrtle genotype showed a higher plant conversion rate compared to the black-fruited myrtle genotype. This study underlines the potential of cryopreservation as a viable method for the long-term conservation of myrtle genotypes and highlights the effectiveness of encapsulation in

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

enhancing plant regeneration from preserved material.



Figure 5. The appearance of some myrtle plants obtained from synthetic seeds

Plant tissue culture techniques are extensively utilized in biotechnological methods to conserve plant genetic resources. The production of synthetic seeds and their short-term preservation at +4°C or long-term (for as long as desired) storage at -196°C is feasible. Conducting research in this area and optimizing protocols is of utmost importance.

The production of synthetic seeds involves various steps and factors that must be optimized for each plant species. These factors include the selection of explants, the composition of the culture medium, the addition of plant growth regulators, and the encapsulation technique. Different encapsulating materials like sodium alginate or calcium alginate have been used to protect somatic embryos or meristematic tissues. The encapsulated materials are typically treated with a calcium chloride to form a gel-like matrix (Prakash et al., 2018). Research has been conducted on various plant species to develop protocols for synthetic seed production. For instance, studies have been conducted on endangered medicinal plants like *Satureja khuzistanica*, *Swertia chirayita*, and *Mentha arvensis*. These studies have demonstrated successful synthetic seed production and subsequent plant regeneration. In the case of *Satureja khuzistanica*, the encapsulation of microcuttings using sodium alginate resulted in genetically stable plants with high rosmarinic

acid content (Asadi et al., 2022). In *Swertia chirayita*, synthetic seed production was achieved through somatic embryogenesis, and the seeds showed high germination rates (Kumar & Chandra, 2013). Similarly, in *Mentha arvensis*, shoot tip, and nodal explants were encapsulated in sodium alginate beads, leading to successful plant regeneration (Islam & Bari, 2014). The success of synthetic seed production depends on various factors such as the choice of explant, composition of the culture medium, encapsulation technique, and the subsequent conversion of synthetic seeds into plants. Optimizing these factors is crucial to achieve high conversion rates and ensure the genetic stability of the regenerated plants (Prakash et al., 2018). Also, storage conditions and post-encapsulation treatments can affect synthetic seeds' viability and conversion efficiency (Taha et al., 2013). In conclusion, synthetic seed production is a valuable technique for the rapid and mass propagation of plant species that do not produce viable seeds or for the conservation and distribution of germplasm. It offers advantages such as uniformity, scalability, and long-term storage potential. The success of synthetic seed production depends on various factors, and their optimization is necessary to achieve high conversion rates and maintain the genetic stability of regenerated plants. Further research and development are needed to enhance and

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

expand the application of synthetic seed technology across different plant species.

To date, such studies have been carried out on various plant species. Notable examples include citrus (Sekai et al., 1990), apple (Hao et al., 2001), grape (Matsumoto et al., 2003), olive (Bradaï et al., 2021), and avocado (O'Brien et al., 2021). These studies underline the versatility and effectiveness of biotechnological approaches in preserving and maintaining diverse plant genetic materials, showcasing the potential for wide-ranging applications in agriculture and horticulture. Upon reviewing the literature, it appears that no studies specifically address the conservation of genetic resources in the myrtle plant. In a study conducted by Dönmez (2022), synthetic seeds were produced in myrtle plants, but unlike our study, no short or long-term preservation efforts were undertaken. Dönmez focused solely on evaluating the plant conversion rates of the synthetic seeds obtained. In this context, our research has yielded significantly important and practically transferable results, surpassing the scope of Dönmez's study in the literature. This highlights the novelty and relevance of our work in the genetic conservation of myrtle plants, contributing valuable insights into the long-term preservation and effective utilization of synthetic seeds in plant biotechnology.

References

- Abbas, M.K., Mahood, H.E., Alhasan, A.S., (2022) Production of synthetic seeds in vegetable crops: A review. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 1060, No. 1, p. 012099). IOP Publishing.
- Aleksic, V., Knezevic, P., (2014) Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiological Research*, 169(4), 240–254.
- Asadi, R., Abdollahi, M.R., Moosavi, S.S., Mirzaie-Asl, A., (2022) Alginate encapsulation of micro-cuttings in endangered *Satureja khuzistanica* species: A promising method for obtaining genetically stable plants with high rosmarinic acid content. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(2), pp.307-320.
- Bradaï, F., Sánchez-Romero, C. (2021) Effect of cryopreservation on the ex vitro establishment of olive plants regenerated via somatic embryogenesis. *Plants*, 10(2), 396.
- Dönmez, D. (2022) Regeneration of plants from alginate-encapsulated shoot tips of myrtle (*Myrtus communis* L.). *Erwerbs-obstbau*, 64(2), 307-314
- Engelmann, F. (2004) Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40, 427-433.

Synthetic seeds involve encapsulating somatic embryos, shoot tips, or other meristematic tissues in a protective coat, facilitating their transformation into plants under *in vitro* or *in vivo* conditions. This method offers several advantages for rapid and mass propagation, uniformity, and long-term germplasm storage. Synthetic seeds can be used to propagate plant species that do not produce viable seeds, such as seedless grapes and watermelons. Additionally, they are valuable for the conservation and exchange of germplasm and the production of elite plant genotypes (Rihan et al., 2017; Abbas et al., 2022).

Conclusion

The research successfully demonstrates the potential of synthetic seed production and cryopreservation as effective tools for conserving *Myrtus communis* L. genotypes. Our comprehensive approach, involving the encapsulation of shoot tips and their subsequent preservation, offers new insights into long-term germplasm storage. The significant plant conversion rates post-cryopreservation underline the robustness of this method. The study paves the way for advanced conservation strategies, ensuring myrtle plants' safeguarding and genetic stability for future generations. This work contributes to conserving myrtle genotypes and sets a precedent for similar efforts in other plant species.

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

- Flamini, G., Cioni, P.L., Morelli, I., Maccioni, S., Baldini, R. (2004) Phytochemical typologies in some populations of *Myrtus communis* L. on Caprione Promontory (East Liguria, Italy). *Food chemistry*, 85(4), 599-604.
- Grzegorzczak, I., Wysokinska, H. (2011) A protocol for synthetic seeds from *Salvia officinalis* L. shoot tips. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 53(1).
- Hao, Y. J., Liu, Q. L., Deng, X.X. (2001) Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. *Cryobiology*, 43(1), 46-53.
- Islam, M.S. and Bari, M.A. (2012) In vitro regeneration protocol for artificial seed production in an important medicinal plant *Mentha arvensis* L. *Journal of Bio-Science*, 20, pp.99-108.
- Kumar, V. and Chandra, S. (2014) High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production of the endangered species *Swertia chirayita*. *Biologia*, 69, pp.186-192.
- Lambardi, M., De Carlo, A. (2003) Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. *Micropropagation of woody trees and fruits*, 815-840.
- Matsumoto, T., Sakai, A., (2003) Cryopreservation of axillary shoot tips of in vitro-grown grape (*Vitis*) by a two-step vitrification protocol. *Euphytica*, 131, 299-304.
- O'Brien, C., Hiti-Bandaralage, J., Folgado, R., Hayward, A., Lahmeyer, S., Folsom, J., Mitter, N., 2021. Cryopreservation of woody crops: The avocado case. *Plants*, 10(5), 934.
- Picci, V., and Atzei, A.D. (1996) Ricerche su Specie di Interesse Medicinale ed Aromatico della Sardegna. *Ricerche Morfo-Sistematiche e Biologiche su Finocchio, Liquirizia, Mirto*,
- Prakash, A.V., Nair, D.S., Alex, S., Soni, K.B., Viji, M.M. and Reghunath, B.R. (2018) Calcium alginate encapsulated synthetic seed production in *Plumbago rosea* L. for germplasm exchange and distribution. *Physiology and molecular biology of plants*, 24, pp.963-971.
- Rezaee, A., and Kamali, K. (2014) A New Commercial Protocol for Micropropagation of Myrtle tree. *Adv. Biores*, 5(4);73-79.
- Rihan, H.Z., Kareem, F., El-Mahrouk, M.E. and Fuller, M.P. (2017) Artificial seeds (principle, aspects and applications). *Agronomy*, 7(4), p.71.
- Sakai, A., Kobayashi, S., Oiyama, I. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports*, 9(1), 30-33.
- Serce, S., Simsek, O., Gunduz, K., Aka-Kacar, Y., Ercisli, S. (2008) Relationships among myrtle accessions from Turkey as revealed by fruit characteristics and RAPD. *Roumanian Biotechnology Letters*, 13(6), 4054-4065.
- Şimşek, Ö., Açar, E., Dönmez, D., Şimşek, Ö., Aka Kaçar, Y. (2022) Development of Genic-SSR Markers in Myrtle by RNA-seq. *Erwerbs-Obstbau*, 64(3):475-483. <http://doi.org/10.1007/s10341-022-00644-3>
- Şimşek, Ö., Dönmez, D., Sarıdaş, M.A., Acar, E., Kaçar, Y.A., Kargı, S.P., İzgü, T. (2023) In vitro and ex vitro propagation of Turkish myrtles through conventional and platform bioreactor systems. *PeerJ*, 11:p.e16061. <http://doi.org/10.7717/peerj.16061>
- Simsek, O., Donmez, D., Saridas, M.A., Paydas-Kargi, S., and Aka-Kacar, Yildiz. (2020) Genetic relationship and polymorphism of Turkish myrtles (*Myrtus communis* L.) as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR). *Appl Ecol Environ Res*, 18(1), pp.1141-1149.
- Sumbul, S., Aftab Ahmad, M., Asif, M., Akhtar, M. (2011) *Myrtus communis* Linn. - A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2(4), 395-402.
- Taha, R. M., Mahmud, N., Yaacob, J. S., Abdullah, N., Mohajer, S. (2013) Synthetic Seeds Production and Regeneration of *Oxalis triangularis* for mass propagation and conservation. *IJESD*, 461-464.

Synthetic Seed Production and Cryopreservation for Myrtle (*Myrtus communis* L.) Genotypes

- Tan, A. (1998) Current status of plant genetic resources conservation in Turkey. In International Symposium on In Situ Conservation of Plant Genetic Diversity, Antalya (Turkey), 4-8 Nov 1996. Central Research Institute for Field Crops.
- Towill, L.E., Bajaj, Y.P.S. (Eds.). (2002) Cryopreservation of plant germplasm II (Vol. 2). Springer Science & Business Media.



Araştırma Makalesi

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Berat ÇINAR ACAR^{1*}, Hazer YÜKSEKDAĞ²

ÖZ

Bu çalışmada, tavuk gastrointestinal sisteminden elde edilen 25 laktobasil izolatının β -glukozidaz, β -galaktozidaz enzim aktiviteleri ve hücre içi/hücre dışı folat üretim miktarları belirlenmiştir. İzolatların, β -glukozidaz ve β -galaktozidaz aktiviteleri sırasıyla, 0.42 U/mg-7.40 U/mg ve 0.06 U/mg-6.35 U/mg arasında değişirken, hücre içi folat üretimleri 10.1 μ g/L-124.2 μ g/L, hücre dışı folat üretimleri ise 4.2 μ g/L-121.0 μ g/L arasında değişkenlik göstermiştir. Çalışmada, farklı parametrelerin (pH, sıcaklık) β -glukozidaz/ β -galaktozidaz enzim aktivitesi ve hücre içi/dışı folat üretimleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. İzolatların hem enzim aktivitelerinin hem de hücre içi/hücre dışı folat üretimi için optimum pH'nın 6.2, sıcaklığın 37°C olarak tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Laktobasil, β -glukozidaz, β -galaktozidaz, folat

The Relationship Between Intracellular and Extracellular Folate Production and β -Glucosidase and β -Galactosidase Enzyme Production of Lactobacillus Genus Bacteria

ABSTRACT

In this study, β -glucosidase, β -galactosidase enzyme activities, and intracellular/extracellular folate production amounts of 25 lactobacillus isolates obtained from the chicken gastrointestinal tract were determined. While the β -glucosidase and β -galactosidase activities of the isolates ranged between 0.42 U/mg-7.40 U/mg and 0.06 U/mg-6.35 U/mg, respectively, their intracellular folate production was 10.1 μ g/L-124.2 μ g/L, extracellular folate production varied between 4.2 μ g/L-121.0 μ g/L. The effect of different parameters (pH, temperature) on β -glucosidase/ β -galactosidase enzyme activity and intracellular/extracellular folate production was investigated in the study. The optimum pH for the isolates' enzyme activities and intracellular/extracellular folate production was 6.2, and the temperature was 37°C.

Keywords: *Lactobacillus*, β -glucosidase, β -galactosidase, folate

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0003-4662-0865, 0000-0001-7953-2920

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 17.11.2023

Kabul Tarihi: 24.05.2024

¹ Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, Türkiye

² Gazi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Gölbaşı, Ankara, Türkiye

*E-posta: beratcinar@gazi.edu.tr

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Giriş

Enzimler, organizmalarda çeşitli biyolojik fonksiyonlara aracılık eden hayati moleküllerdir (Wang ve ark., 2019). Proseste kendileri tüketilmeden substrat moleküllerini farklı ürünlere dönüştürürler. Yüksek özgülük ve katalitik etkinlik nedeniyle vücuttaki enzim metabolizmasının dengesizliği birçok hastalığa neden olabilmektedir (Wu ve ark., 2021; Lian ve ark., 2022). Bu nedenle, enzim aktivitesinin yüksek hassasiyet ve doğrulukla belirlenmesi oldukça önemlidir.

Endüstriyel enzim kullanımı, tüketici tercihleri, çevre ve doğal kaynakların tükenmesine yönelik endişeler nedeniyle önemli ölçüde artmıştır. Enzimatik süreçler, daha az enerji gerektirmesi, toksik olmaması, çevre dostu ve daha sürdürülebilir olması nedeniyle ilaç, süt ürünleri, tekstil, kağıt, deri, biyoyakıtlar, deterjanlar, özel kimyasallar, deterjanlar ve tüketici ürünleri gibi bir çok endüstride kullanılmaktadır (Wu ve ark., 2021, Sheldon ve ark., 2022, Kabir ve Ju, 2023). Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve özellikle laktobasiller, sahip oldukları primer (asitler, enzimler, vitaminler vb.) ve sekonder metabolitleri (bakteriyosin vb.) nedeniyle endüstride yoğun ilgi gören bir bakteri grubudur (Zacharof ve ark., 2010). LAB, bozulabilir gıdaların ve süt, sebze, et, balık, baklagiller ve tahıllar gibi diğer gıdaların besleyici niteliklerini ve raf ömrünü iyileştirmek için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır (Sumengen ve ark., 2013). Gastrointestinal sistemde de yaygın olarak bulunan LAB enzim ve vitamin kaynağı olarak kullanılabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla sıklıkla taranmaktadır.

Glukosidazlar, doğada glikozitlerin hidrolizini katalize edebilen çok yaygın bir enzim grubudur. β -glukozidaz (β -glu), biyotransformasyon, sekonder metabolizma, patojenlere karşı bitki savunması ve insan dokularında ve hücre duvarlarında glukozit seramid katabolizması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rol oynayan glukozidaz türüdür (Bi ve ark., 2019; Chen ve ark., 2021; Yuan ve ark., 2022). Disakkaritler, oligosakkaritler ve diğer glukoz içeren moleküllerdeki β -glikosidik bağları hidrolize edebilme yeteneği gösterirler (Liu ve

ark., 2022; Yao ve ark., 2023). β -glukozidazlar, glukozidik bağların hem sentezini hem de bozunmasını katalize eden çift karakterli enzimlerdir (Pereira ve ark., 2023). Memelilerde, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan bu enzim, Gaucher hastalığı, nekrotizan enterokolit, lizozomal depo hastalığı, metastatik kanser gibi hastalıklarda erken teşhisi için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Zhou ve ark., 2017; Han ve ark., 2021; Sinha ve ark., 2021). Ayrıca, gıda endüstrisinde içeceklerin tatlarının iyileştirilmesinde ve soya fasulyesi ürünlerindeki glikosil flavonoidlerin glikozit parçalarını uzaklaştırılmasında da oldukça önemlidir. Bu sayede flavonoidler bağırsak tarafından kolaylıkla emilebilmekte ve yararlı etki sağlayabilmektedir (de Ovalle ve ark., 2021; Ningtyas ve ark., 2021; Liu ve ark., 2022).

Glikozit hidrolaz enzimi olan β -galaktozidaz (β -gal), gıda endüstrisinde laktoz içermeyen süt ürünleri üretiminde kullanılmaktadır. Sütte bulunan laktozu hidrolize ederek laktoz sindirim bozukluğunun etkilerini önlemeye yardımcı olması nedeniyle gıda endüstrisinde kullanılan en önemli biyoteknolojik enzimlerden biridir (Kayukawa ve ark., 2020). Laktozun allolaktoza transgalaktosilasyonunu katalize etme yeteneği gösteren β -galaktozidaz enzimi, allolaktoz sentezinin ardından, disakkariti galaktooligosakkaritlere (prebiyotik) polimerize edebilmektedir (Yañez-Neco ve ark., 2021). β -galaktozidaz, laktoz açısından zengin ortamlarda çok sayıda mikroorganizmadan etkili bir şekilde elde edilebilmektedir (Bentahar ve ark., 2019). Yararlı bir raportör enzim olarak iyi bilinen β -galaktozidaz, gen ekspresyonu, enzime bağlı immünosorbent testi, transkripsiyon, transfeksiyon ve hibridizasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birkaç çalışma, β -galaktozidazın kolorektal ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar için güçlü bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir (Asanuma ve ark., 2015; Gu ve ark., 2016; Kim ve ark., 2017; Lee ve ark., 2021).

Folat (B9 vitamini), hücre bölünmesi, DNA replikasyonu, metilasyon, nükleotit biyosentezi ve amino asit metabolizmasında yer aldığı için

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

insan metabolizması için gereklidir (Preedy, 2013; Mahara ve ark., 2019). Nöral tüp defektleri, megaloblastik anemi ve kolorektal kanser gibi birçok sağlık bozukluğuna yol açan folat eksikliği hem gelişmiş hem de düşük gelirli ülkelerde küresel bir sağlık sorun haline gelmiştir (Bailey ve ark., 2015; Bationo ve ark., 2020). Folat sadece bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmektedir (Donnelly, 2001). İnsan vücudunda üretilmediği için besinler yoluyla alınması gerekmektedir (Mahara ve ark., 2019). Maya ve birçok laktik asit bakterisi (LAB), fermantasyon sırasında folatı sentezleyebildiğinden, fermantasyon ayrıca gıda ürünlerinin folat içeriğini artırmanın iyi bir yolu olarak kabul edilmektedir (Saubade ve ark., 2017). *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* dâhil olmak üzere birçok LAB'nin folat üretebildiği ve farklı suşların folat üretim kapasitelerinin de değişebileceği bildirilmiştir (Mattarelli ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2020).

Doğal kaynaklardan izole edilen mikroorganizmaların ürettikleri primer metabolitlerin (enzim, vitamin gibi) endüstriyel üretimde kullanılabilmesi ve büyük ölçekli süreçlerde uygulanabilmesi için öncelikli olarak kullanılacak mikroorganizmanın üretilen metabolitler açısından laboratuvar koşullarında taranmasına odaklanılmaktadır. Bu amaçla bu çalışmada, enzim ve vitamin üretiminde endüstriyel olarak kullanılabilirliği olabilecek izolatlar taranmıştır. Çalışmada, tavuk gastrointestinal sisteminden elde edilen 25 laktobasil bakterisinin β -glukozidaz/ β -galaktozidaz enzim aktivitesi ve hücre içi/hücre dışı folat üretim kapasitelerinin belirlenerek endüstriyel üretimlerde potansiyel bakteri olabirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca, yüksek β -glukozidaz/ β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesine ve yüksek hücre içi ve hücre dışı folat üretimine sahip izolatlarında, farklı pH ve sıcaklık koşullarının enzim aktivitesine ve folat üretimine etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem Bakteriler ve Elishme Ortamları

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı stok kültür koleksiyonunda yer alan, tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen 25 laktobasil izolatının β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi ve hücre içi/hücre dışı folat üretim kapasitelerinin belirlenmesinde Man & Rogosa ve Sharp (MRS, 10 g/L pepton, 5 g/L yeast ekstrakt, 10 g/L beef ekstrakt, 20 g/L glukoz, 2 g/L dipotasyum fosfat, 5 g/L sodyum asetat, 0.2 g/L magnezyum sülfat, 0.05 g/L mangan sülfat, 2 g/L amonyum sitrat, 1.08 mL tween 80, pH 6.2) besi ortamı kullanılırken β -galaktozidaz enzim aktivitesinin belirlenmesinde ise MRS içeriğindeki %2'lik glukoz yerine aynı oranda laktoz ilave edilen Lac-MRS besiyeri kullanılmıştır. İzolatların gelişmeleri MRS besi ortamında 37°C'de 24 saat inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Enzim Aktivitesi

Uygun besi ortamlarında iki kez aktifleştirilen izolatlar, inkübasyon sonunda 5000 rpm'de 20 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir (Sigma 2-16 KC). Hücre pelleti serum fizyolojik (SF, %0.876 NaCl) ile iki kez yıkanarak Mc Farland 5'e (~15 log kob/mL) ayarlanmıştır. Kültürlerden elde edilen pellet β -glukozidaz enzim aktivitesi çalışmalarında 0.5 M potasyum fosfat (%0.02 KCl, %0.144 Na₂HPO₄, %0.8 NaCl, %0.024 KH₂PO₄, pH 6.2) ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi çalışmalarında ise 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.2) ile yıkanmış ve örnekler 1 mL'lik uygun tamponda çözülmüştür. İzolatların hücre duvarı, ultrasonikasyon cihazı (50 MHz, 5 dk, Vibra-Cell, Sonics & Materials Inc. Danbury) ile parçalanmış ve hücre atıkları 1000 rpm'de 10 dk +4°C'de santrifüj ile uzaklaştırılmıştır.

β -glukozidaz Aktivite: Enzim aktivitesinin ölçümü için substrat olarak p-nitrofenil- β -D glukopiranozit (p-NPG) kullanılmıştır (Matsuda ve ark., 1994; Strahsburger ve ark., 2017). 0.5 M potasyum fosfat tamponunda (pH 6.2), 2 mL 2.5 mM p-NPG içeren karışıma, hücre süspansiyonundan 0.5 mL eklenmiş ve karışım 30°C'da 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için karışım 95°C'da 5 dk bekletilmiştir. β -glukozidaz aktivite tespiti

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

için 420 nm dalga boyunda (Hitachi UV-1800) ölçüm yapılmıştır (Choi ve ark., 2002).

β -galaktozidaz Aktivite: Enzim aktivitesinin belirlenmesinde substrat olarak o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozit (oNPG, Sigma) kullanılmıştır. 0.03 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.8) içinde, 15 mM 0.2 mL o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozit (o-NPG) içeren karışıma, enzim ekstraktından 1 mL eklenmiş ve 37°C'da 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için 1 M 0.5 mL sodyum karbonat (Merck) solüsyonu eklenmiştir. 1000 rpm'de 10 dk +4°C'da santrifüj edilmiş ve β -galaktozidaz aktivite tespit için 420 nm dalga boyunda (Hitachi UV-1800) ölçüm yapılmıştır (Zhang ve ark., 2012). Enzim aktivite çalışmalarında, hücre dışı β -Glu/ β -Gal aktivitesi için kültürlerin süpernatantı, hücre içi β -Glu/ β -Gal aktivitesi için ise pellet kullanılmıştır (Matsuda ve ark., 1994; Zhang ve ark., 2012).

1 ünite enzim aktivitesi dakikada 1 μ mol ürünü serbest bırakan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Bir miligram (mg) proteinde bulunan enzim ünite sayısı ise spesifik aktivite olarak kabul edilmektedir ($U = \mu\text{mol/dk}$). Enzimin saflığını kabaca tanımlamak için kullanılan spesifik aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır (Temizkan ve ark., 2008).

Enzim aktivitesi = $(V_t \times dA/dt \times \text{dilüsyon faktörü}) / (\epsilon \lambda \times v_s \times d) = (U/mL)$

$\epsilon \lambda$ = Absorpsiyon katsayısı ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)

d = Küvetin ışık yolu (genellikle 1 cm)

dA/dt = Birim zamanda (dakikada) absorbans değişimi (dk^{-1})

V_t = Reaksiyon karışımının toplam hacmi (mL)

v_s = Reaksiyona katılan örnek (enzim) hacmi (mL)

Spesifik enzim aktivitesi ise aşağıda yer alan formüle göre hesaplanmıştır;

Spesifik Aktivite (U/mg) = $(\text{Enzim aktivitesi } (U/mL) / (\text{Protein miktarı } (\text{mg/mL}))$

pH ve Sıcaklığın β -glukozidaz/ β -galaktozidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

β -glukozidaz aktiviteleri belirlenen izolatlardan, en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren iki laktobasil izolatı (ZD26 ve ZD37) ve β -glakozidaz aktiviteleri belirlenen izolatlardan en yüksek spesifik aktiviteyi gösteren iki laktobasil izolatı (ZD22 ve ZD34) seçilerek farklı pH ve sıcaklığın enzim aktivitelerine etkisi tespit edilmiştir.

Farklı pH'lardaki enzim aktivitelerin belirlenmesinde; β -glukozidaz için reaksiyon ortamı olan 0.5 M potasyum fosfat tamponunun ve β -galaktozidaz için ise reaksiyon ortamı olan 0.03 M potasyum fosfat tamponunun pH'sı 5.5, 6.2 (Kontrol) ve 7.5'e ayarlanarak reaksiyon 30°C, 37°C (Kontrol) ve 45°C'de gerçekleştirilmiştir (Kara, 2004; Ismail ve ark., 2010; Cinar Acar ve Yuksekdog, 2023).

Folat Üretimi

Sybesma ve ark. (2003 a,b) ve Aswathy ve ark. (2008) metotlarında bazı değişiklikler yapılarak bakterilerin folat üretme kapasitesi tespit edilmiştir. MRS besi ortamı ve 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.2) kullanılarak bakterilerin hücre içi ve hücre dışı folat üretimleri belirlenmiştir.

Hücre içi folat üretimi: Mc Farland 5'e ($\sim 15 \log$ kob/mL) ayarlanan izolatlar besi ortamına %2 oranında eklendikten sonra 37°C'de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 5 dk boyunca 50 MHz frekansta sonikasyon işlemi uygulanmıştır. Folat bağlayıcı proteinlerin folattan ayrılması için örnekler 100°C'de 15 dk bekletildikten sonra 4000 $\times g$ 'de 10 dk 4°C'da santrifüj edilmiştir. Sıcak su banyosunda ikinci kez (5 dk) bekletme işleminden sonra 10 000 $\times g$, 5 dk, 4°C yeniden santrifüj yapılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası oluşan süpernatant 0.45 μm 'lik filtreden geçirilmiş ve 96'lık mikro-kuyucuklarda OD₅₈₀ nm'de ölçüm yapılarak hücre içi folat üretim miktarı tespit edilmiştir. 0.1-10 $\mu\text{g/L}$ arasında değişen derişimlerde standart çözeltiler hazırlanarak bakterilerdeki folik asit konsantrasyonu spektrofotometrede ölçülmüştür ve hücre içi folat üretimi $\mu\text{g/L}$ cinsinden hesaplanmıştır (Horne ve Patterson, 1988).

Hücre dışı folat üretimi: Mc Farland 5'e ($\sim 15 \log$ kob/mL) ayarlanan izolatlar besi ortamına %2

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

oranında eklendikten sonra 37°C'de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 12 000xg'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Aynı oranda (1:1) süspansiyon edilen süpernatant ve potasyum fosfat tamponu karışımdan folat bağlayıcı proteinlerin ayrılması için örnekler 100°C'de 15 dk bekletilmiş ve 4000xg'de 10 dk 4°C'da santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatanta (2 mL) 0.4 mL insan plazması, 0.1 M 2-merkaptetanol, %0.5 sodyum askorbat eklenerek çalkalamalı etüvde 37°C'da 1 saat süresince bekletilmiştir. Sıcak su banyosunda ikinci kez (5 dk) bekletme işleminden sonra 27 000xg, 10 dk, 4°C santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant 0.45 μ m'lik filtreden geçirilmiş ve 96'lık mikrokuyucuklarda OD₅₈₀ nm'de ölçüm yapılarak hücre dışı folat üretim miktarı tespit edilmiştir.

pH ve Sıcaklığın Folat Üretimine Etkisi

Farklı sıcaklık ve pH' koşullarının folat üretimini artırıcı ya da azaltıcı etkisinin bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla hücre içi ve hücre dışı folat üretimi en yüksek çıkan iki izolat (ZD20 ve ZD28) seçilmiştir. İzolatlar pH'sı 5.5, 6.2, 7.5'ye ayarlanmış 0.1 M potasyum fosfat tamponu içeren MRS besi ortamında (pH değişimi ve potansiyel olarak folat analizini etkileyebilecek reaktif türlerin oluşumunu engellemek amacıyla steril olarak filtrelenen) geliştirilmiştir. Ardından 15 ile 30 saat boyunca üç farklı sıcaklıkta (30, 37 ve 45°C) gelişmeye bırakılmıştır. İzolatların 30, 37 (Kontrol), 45°C ve pH 5.5, 6.2 (Kontrol), 7.5 koşullarındaki hücre içi ve hücre dışı folat üretim kapasiteleri yukarıda verilen yöntemlere göre belirlenmiştir.

İstatistiksel Analizler

Tüm çalışmalar üç paralel ve üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir ve bulunan değerlerin ortalama sonuçları verilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler bu tekrarların ortalaması \pm standart sapma (SD) şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS Inc. Yazılım (sürüm 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL) kullanılmıştır. Değişkenlerin her birinin (β -glukozidaz, β -galaktozidaz, hücre içi ve hücre

dışı folat üretimi) ayrı ayrı birbirleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile belirlenmiştir. Değişkenler arasındaki korelasyonun önem değerleri $p < 0.01$ olarak belirlenmiştir.

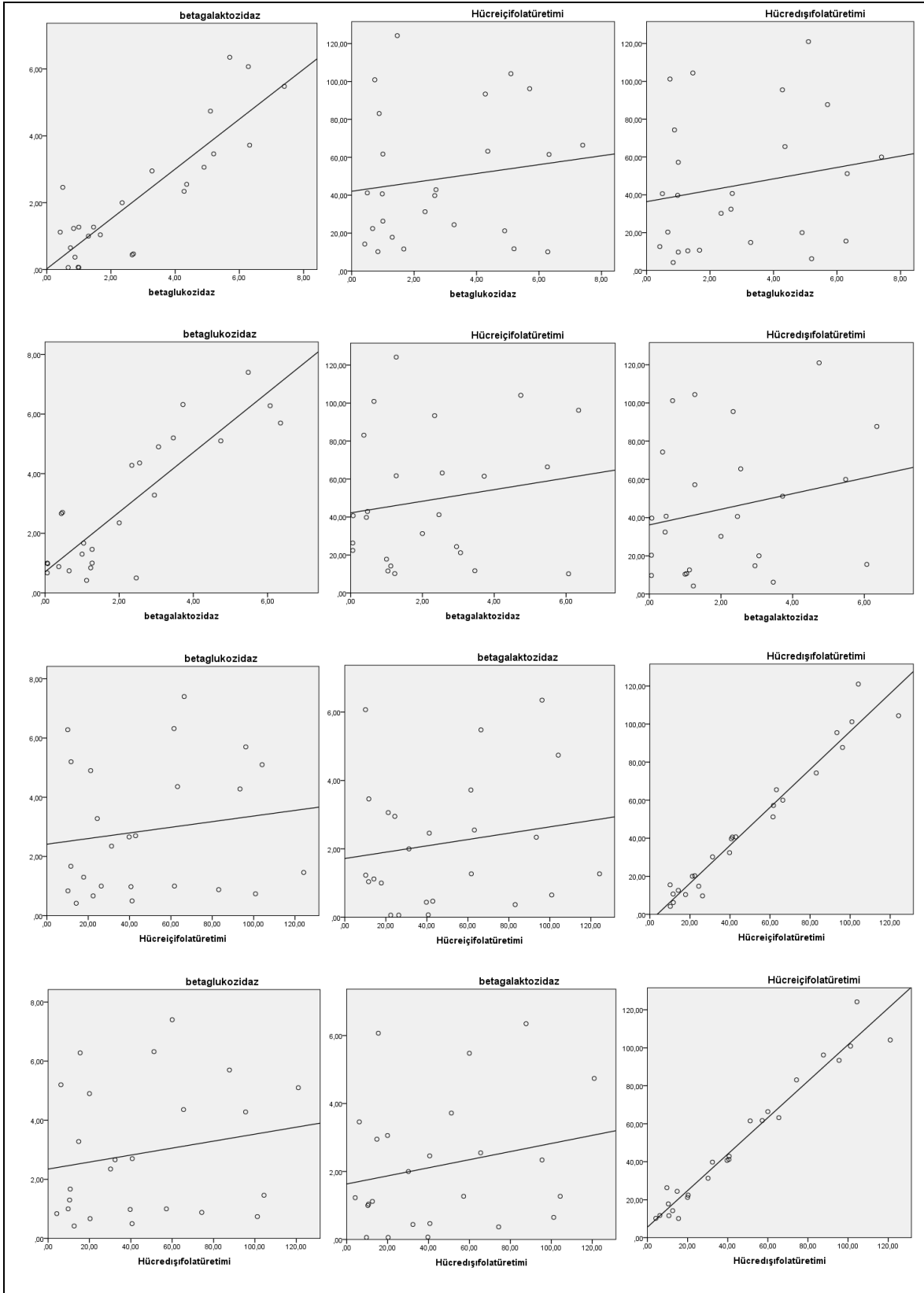
Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen toplam 25 izolatın β -glukozidaz ve β -galaktozidaz enzim aktiviteleri ve folat üretim yetenekleri (değişkenler) araştırılmış ve istatistiksel olarak değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkileri serpmme grafikleri ile Şekil 1'de gösterilmiştir.

Beta-glukozidaz, glikozidik bağın hem sentezini hem de bozunmasını içeren çift karakterli bir enzimdir ve β -glukozidazın bu özelliği, onu endüstriyel açıdan muazzam potansiyele sahip bir enzim yapmaktadır (Singh ve ark., 2016; Srivastava ve ark., 2019).

Çalışmamızda, 25 izolatan *Lactobacillus* sp. ZD33 0.42 U/mg ile en düşük, *Lactobacillus* sp. ZD26 izolatu ise 7.40 U/mg ile yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi göstermiştir (Tablo 1). Tsangalis ve ark. (2002), *Bifidobacterium longum*-b'nin MRS-glu besi ortamında geliştirildiğinde β -Glu aktivitesinin 4.625 U/mg olduğunu bildirmişlerdir. 63 *Lactobacillus* suşunun β -Glu aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, en yüksek enzim aktivitesinin pH 6.4 ve 42°C'de *L. rhamnosus* CRL981 (22.93 UE/mg) suşunda gözlemlendiği rapor edilmiştir (Marazza ve ark., 2009). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ve *Propionibacterium* cinslerinin kullanıldığı bir çalışmada, kültürlerin 0.250-3.000 U/mg arasında değişen seviyelerde β -Glu spesifik enzim aktivitesine sahip oldukları ifade edilmiştir. Genel olarak *Propionibacterium* suşlarının, diğer *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* suşlarına kıyasla daha düşük spesifik aktivite gösterdiği ve enzimatik aktivitenin türe, büyüme ortamına ve kültür koşullarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Yuksekdag ve ark., 2018).

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki



Şekil 1. Değişkenlerin (β -glukozidaz, β -galaktozidaz, hücre içi folat üretimi ve hücre dışı folat üretimi) birbirleriyle olan ilişkilerini gösteren serpmne grafikleri

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Tablo 1. *Lactobacillus* izolatlarının β -galaktozidaz/ β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi ile hücre içi/hücre dışı folat üretimleri

<i>Lactobacillus</i> izolatları	β -glukozidaz (U/mg) Spesifik Aktivite	β -galaktozidaz (U/mg) Spesifik Aktivite	Hücre içi folat üretimi (μ g/L)	Hücre dışı folat üretimi (μ g/L)
ZD 11	5.20±0.10	3.46±0.00	11.7±0.1	6.2±0.0
ZD 13	1.30±0.00	1.00±0.00	17.8±0.3	10.4±0.3
ZD 14	2.70±0.15	0.47±0.10	42.9±1.0	40.7±0.0
ZD 15	1.00±0.00	0.06±0.00	26.3±1.3	9.7±0.7
ZD 16	2.66±0.21	0.44±0.00	39.8±1.5	32.4±1.0
ZD 17	0.98±0.00	0.07±0.00	40.7±0.6	39.7±0.0
ZD 18	0.88±0.00	0.37±0.00	83.1±1.2	74.3±1.2
ZD 19	0.74±0.10	0.65±0.10	100.9±0.1	101.2±1.3
ZD 20	1.46±0.10	1.27±0.10	124.2±1.2	104.4±0.0
ZD 21	2.35±0.20	2.00±0.15	31.3±0.4	30.2±0.0
ZD 22	5.70±0.10	6.35±0.00	96.2±1.3	87.7±1.2
ZD 23	4.28±0.00	2.34±0.00	93.4±0.0	95.5±0.0
ZD 24	1.00±0.00	1.27±0.12	61.7±0.0	57.2±0.7
ZD 26	7.40±0.00	5.48±0.11	66.4±0.1	60.0±0.0
ZD 27	4.90±0.20	3.06±0.00	21.2±0.0	20.0±0.4
ZD 28	5.10±0.10	4.74±0.15	104.1±0.2	121.0±0.0
ZD 29	0.84±0.00	1.23±0.00	10.2±0.1	4.2±1.1
ZD 30	1.67±0.10	1.04±0.00	11.6±1.1	10.7±1.2
ZD 31	0.67±0.15	0.06±0.10	22.4±0.0	20.3±0.0
ZD 32	0.50±0.00	2.46±0.10	41.2±0.3	40.6±0.6
ZD 33	0.42±0.10	1.12±0.20	14.2±0.1	12.6±0.0
ZD 34	6.28±0.00	6.07±0.00	10.1±0.4	15.5±0.8
ZD 35	4.36±0.10	2.55±0.00	63.2±0.0	65.5±0.0
ZD 37	6.32±0.00	3.72±0.00	61.5±0.0	51.2±0.0
ZD 38	3.28±0.00	2.95±0.00	24.4±0.5	14.8±1.2

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Başka bir çalışmada, β -glukozidaz aktivitesine sahip potansiyel probiyotik suşlar arasından, *L. perolens* FI10842'nin en yüksek (49.10 mU/mL), *L. brevis* FI10700'in en düşük (2.13 mU/mL) β -glukozidaz aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Son ve ark., 2018). Cinar Acar ve Yuksekdağ (2023). çalışmalarında gıda (peynir, yoğurt) ve hayvansal (tavuk) kaynaklı 39 *Lactobacillus* spp. ile insan kaynaklı (yenidoğan dışkısı) üç *Bifidobacterium* spp. kullanmışlar ve kültürlerin β -glu spesifik aktivitelerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, *Lactobacillus* suşlarının 0.250-4.500 U/mg, Bifidobakterilerin ise 1.200-2.670 U/mg arasında spesifik aktivite yeteneği gösterdiklerini bildirmiştir. Lorn ve ark. (2021) Kamboçya ve Vietnam fermente gıdalarından izole ettikleri 200 LAB'nin β -glukozidaz aktivitesini incelemişler ve 40 suş'un

β -glukozidaz pozitif olduğunu, bunlar arasından 14 suşun ise 10-27 UA arasında enzim aktivitesi sergilediklerini rapor etmiştir.

β -Galaktozidaz, yaygın adı laktaz olan ve galaktoz ve glukoz arasındaki β -glikozidik bağın hidrolizini katalize eden bir enzimdir (Juers ve ark. 2012; Kolev ve ark. 2022). Sindirilmemiş laktozun ince bağırsakta emilmesi bu enzimin aktivitesine bağlıdır (Saqib ve ark., 2017). Fermente gıdalarda bulunan LAB, ürettikleri laktaz enzimi ile laktoz sindirimine yardımcı olur ve sağlık açısından belirgin avantajlar sağlarlar. Laktoz intoleransı semptomları, insan patojeninin adezyonunu önleyen ve β -galaktosidaz üreten probiyotiklerle desteklenen süt ürünleriyle yönetilebilir (Vasudha ve ark. 2023).

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Çalışmamızda 25 izolatın kantitatif β -galaktozidaz taramasında, tüm izolatların β -galaktozidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. *Lactobacillus* sp. ZD15 ve ZD31 izolatları 0.06 U/mg ile en düşük, *Lactobacillus* sp. ZD22 izolatı ise 6.35 U/mg ile en yüksek β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesi göstermiştir (Tablo 1). Yüksek β -galaktosidaz aktivitesine sahip olan ZD22 ve ZD34 izolatları fermente ürünlerin geliştirilmesinde starter ve potansiyel probiyotik kültürler olarak kullanıldıklarında laktoz intoleransı semptomlarını hafifletebilir. Gül Güven ve ark. (2011). termoasidofilik *Alicyclobacillus acidocaldarius rittmannii*'den elde ettikleri ve saflaştırdıkları intraselüler β -galaktozidaz enziminin spesifik aktivitesinin 113 U/mg olduğunu bildirmişlerdir. β -galaktozidaz'ın probiyotik *Pediococcus acidilactici*'den izole edildiği ve saflaştırıldığı başka bir çalışmada, enzimin 0.883 U/mg spesifik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Chanalia ve ark., 2018). Kılıc ve ark. (2014) 39 *Lactobacillus* ve 3 *Bifidobacterium* cinsine ait toplam 42 bakteriyi çalışmalarında kullanarak β -galaktozidaz spesifik aktivitelerini tespit etmişlerdir. *Lactobacillus* cinsi içerisinde en yüksek ve en düşük enzim aktivitesi sırasıyla *L. fermentum* (2.468 U/mg) ve *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (0.065 U/mg) suşlarında gözlenirken, *Bifidobacterium* cinsinde 0.420-0.726 U/mg arasında β -galaktozidaz aktivite belirlendiği bildirilmiştir. Petrol istasyonundan izole edilen *Enterobacter* sp.'nin, 76.5 U/mg β -galaktozidaz üretme yeteneği gösterdiği tespit edilmiştir (Shaikhan ve ark., 2020). Yüksekdağ ve Yüksekdağ (2021) çalışmalarında, 31 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve 34 *Streptococcus thermophilus* bakterisinin β -galaktozidaz spesifik aktivitesini incelemişler ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* suşlarının 0.186-6.500 U/mg arasında, *S. thermophilus* suşlarının ise 0.172-5.064 U/mg arasında β -galaktozidaz aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Enzimler, mikroorganizma cinsine/türüne göre intraselüler veya ekstraselüler olarak üretilmektedir (Palmer ve Bonner, 2007; İsmail ve ark., 2010). Çalışmada izolatların

enzim aktiviteleri hem hücre pelletinde hem de kültür süpernatantında çalışılmış ancak hücre pelletinde β -glukozidaz/ β -galaktozidaz aktivite belirlenirken, kültür süpernatantında tespit edilmemiştir. Böylece izolatların her iki enzimi de intraselüler olarak sentezledikleri desteklenmiştir. Ayrıca çalışmada izolatların spesifik β -glukozidaz ve β -galaktozidaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı bir ilişki (Pearson Correlation katsayısı 0.865) bulunmuştur (Şekil 1). Yaptığımız enzim çalışmalarında elde edilen sonuçlar bazı araştırmacıların sonuçlarına benzerlik gösterirken, bazılarınkinden düşük ve/veya yüksek bulunmuştur. Bu farklılıklar; enzim çalışmalarında kullanılan besiyeri, bakteri yoğunluğu ve enzim/substrat miktarı, enzim ekstraksiyon metodu, reaksiyon ortamının sıcaklığı, pH'ı ve enzim aktivite hesaplanma yöntemlerindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Enzimlerin hem pH'a hem de sıcaklığa duyarlı olduğundan enzimatik süreçlerde sıcaklık ve pH'ın optimize edilmesi önemlidir. pH, birçok fonksiyonel amino asit grubunun protonasyon (protonlanma veya protonlaşma; bir atom, molekül veya iyon proton eklenerek konjuge asidin oluşturulması) derecelerini ve dolayısıyla protein katlanmasını, aktif bölge işlevselliğini ve enzim stabilitesini etkiler. pH ayrıca bazı substratların protonasyonunu ve enzimlerin aktif bölgeleriyle iyonik etkileşimlerini de etkiler. Bu nedenle her enzimin belirli bir reaksiyon için optimal bir pH'ı vardır ve ilgili enzimatik süreç, optimal pH'ta veya buna yakın bir seviyede çalıştırılmalıdır. Enzim, kaynak organizmanın doğal ortamına bağlı olarak belirli sıcaklıkta optimum şekilde çalışır. Enzimlerin birçoğu çok hassastır ve optimum sıcaklık aralığının dışında ani aktivite düşüşü meydana gelebilir. Sıcaklığın artırılması enzim reaksiyon hızını artırabilir ancak bu durum enzimin termal stabilitesini, denatürasyonunu ve inaktivasyonunu etkiler (Arcus ve ark., 2020; Kabir ve Ju, 2023). Bu amaçla endüstriyel alanda kullanılacak enzimlerin farklı pH ve sıcaklıklarda aktivitelerinin belirlenmesi önemlidir. Çalışmamızda yüksek spesifik β -glukozidaz/ β -galaktozidaz enzim aktiviteleri gösteren ikişer

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktosidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

izolat seçilmiş (sırasıyla; ZD26 ve ZD37 / ZD22 ve ZD34) ve farklı pH ve sıcaklıklarda spesifik enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Lactobacillus sp. ZD26 izolatında, farklı pH'lardaki (pH 5.5/6.2/7.5) β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesinin sırasıyla, 5.84 U/mg, 7.40 U/mg ve 6.21 U/mg olduğu belirlenirken, ZD37 izolatında β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesinin 4.06 U/mg, 6.32 U/mg ve 5.98 U/mg olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). İzolatların her ikisinin de optimum gelişme gösterdikleri pH olan 6.2 de en yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi gösterdiği bulunmuştur. ZD26 izolatında, pH ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.570) (Şekil 2a) tespit edilirken, ZD37 izolatında, pH ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.671) olduğu belirlenmiştir (Şekil 2b). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile laktobasillerle yapılan bazı çalışmalarla farklılık gösterirken bazılarında benzerlik göstermiştir: Cinar Acar ve Yuksekdag (2023), *L. rhamnosus* BAZ78 suşunun pH 7.5'te, Yuksekdag ve ark., (2017) *L. casei* SC1 ve *L. rhamnosus* EA1 suşlarının pH 7.5'te, Perez-Martin ve ark., (2012), 23 laktik asit bakterisinden üçünün pH 4.0'de geri kalanların ise optimum pH 6'da ve Michlmayr ve ark., (2010) *Lactobacillus brevis* SK3 suşunun pH 5.5'te en yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesine sahip olduklarını rapor etmişlerdir.

β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesine sıcaklığın etkisinin belirlenmesinde ise *Lactobacillus* sp. ZD26 ve ZD37 izolatlarının optimum 37°C'de (gelişme gösterdikleri sıcaklık) β -glukozidaz spesifik enzim aktiviteleri (sırasıyla 7.40 U/mg ve 6.32 U/mg) en yüksek bulunmuştur. ZD26 izolatında, sıcaklık ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında zayıf korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.210) (Şekil 2c) tespit edilirken, ZD37 izolatında, sıcaklık ve β -glukozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.596) (Şekil 2d) olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile laktobasillerle yapılan bazı çalışmalarla farklılık gösterirken bazılarında benzerlik göstermiştir: *L. rhamnosus* BAZ78 suşu 37°C'de (Cinar Acar ve Yuksekdag 2023), *L. casei* SC1 ve *L. rhamnosus* EA1 suşları 30°C'de (Yuksekdag ve ark., 2018), 23 laktik asit bakterisinin optimum 45°C'de (Perez-Martin ve ark., 2012) ve *L. brevis* SK3 suşunun 45°C'de (Michlmayr ve ark., 2010) en yüksek β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesine sahip oldukları bildirilmiştir.

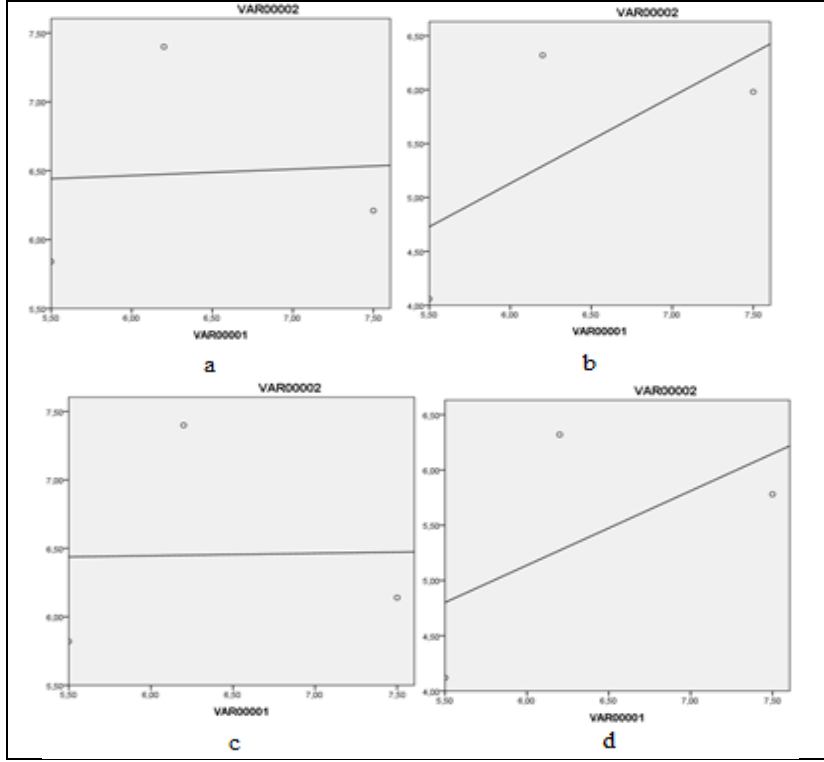
β -Galaktosidazların özellikleri kaynaklarına bağlı olarak değişebilir. Genel olarak, pH profillerine göre; mantar kaynaklarından gelen asidik β -galaktosidazlar ve maya ve bakterilerden gelen nötr β -galaktosidazlar olarak iki gruba ayrılabilirler (Carević ve ark., 2015).

Tablo 2. ZD 26 ve ZD 37 izolatlarının farklı sıcaklık ve pH'daki β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesi

İzolat	pH	Spesifik Aktivite (U/mg)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite (U/mg)
ZD 26	5.5	5.84±0.00	30	5.82±0.02
	6.2 (Kontrol)	7.40±0.00	37 (Kontrol)	7.40±0.00
	7.5	6.21±0.02	45	6.14±0.01
ZD 37	5.5	4.06±0.00	30	4.12±0.00
	6.2 (Kontrol)	6.32±0.00	37 (Kontrol)	6.32±0.00
	7.5	5.98±0.01	45	5.78±0.05

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki



Şekil 2. ZD 26 ve ZD 37 izolatlarının β -glukozidaz spesifik enzim aktivitesinin farklı pH ve sıcaklık ile olan ilişkilerine ait korelasyon grafikleri

Beklenildiği gibi çalışmamızda kullanılan her iki izolat içinde optimum pH'ı nötr pH'a yakın (pH 6.2) bulunmuştur. ZD22 izolatında, farklı pH'lardaki (pH 5.5/6.2/7.5) β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesinin sırasıyla, 2.64 U/mg, 6.35 U/mg ve 5.56 U/mg olduğu belirlenirken, ZD34 izolatında β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesinin sırasıyla 3.50 U/mg, 6.07 U/mg ve 5.22 U/mg olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3). Benzer şekilde LAB türlerinin optimum pH'ının nötr pH aralıkları olduğu rapor edilmiştir (İsmail ve ark., 2010, Kılıç ve ark., 2014, Carević ve ark., 2015, Yüksekdağ ve Yüksekdağ, 2021). ZD22 izolatında, pH ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında orta korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.623) (Şekil 3a) tespit edilirken, ZD34 izolatında, pH ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında orta düzeyde korelasyon (Pearson Correlation katsayısı 0.519) (Şekil 3b) olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık enzim denatürasyonu ve dolayısıyla aktivite düşüşü için önem bir faktördür (Kabir ve Ju, 2023). Tablo 3'te iki izolatın farklı sıcaklıklardaki β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesi verilmiştir. Farklı sıcaklıklarda (30,

37, 45°C) ZD22 ve ZD34 izolatlarının spesifik β -galaktosidaz aktivite seviyelerinin 2.50 U/mg ile 6.35 U/mg arasında olduğu tespit edilmiştir. Her iki izolatın (ZD22, ZD34) en yüksek spesifik enzim aktivitesinin 37°C (sırasıyla; 6.35 U/mg ve 6.07 U/mg) olduğu ve en düşük spesifik enzim aktivitesinin ise 45°C de (sırasıyla; 2.50 U/mg ve 2.67 U/mg) olduğu belirlenmiştir. ZD22 izolatında, sıcaklık ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon (Pearson Correlation katsayısı -0.762) (Şekil 3c) tespit edilirken, ZD34 izolatında, sıcaklık ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon (Pearson Correlation katsayısı -0.506) (Şekil 3d) olduğu belirlenmiştir. Yüksekdağ ve Yüksekdağ (2021), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 ve *S. thermophilus* Z1052 suşlarında 42°C, Kılıç ve ark. (2014), *L. fermentum* ZYN17 suşunda 37°C, Carević ve ark., (2015), *L. acidophilus* ATCC 4356 de optimum 45°C, Nguyen ve ark. (2007) *L. acidophilus* R22 suşunun 45°C de ve İsmail ve ark., (2010) *L. acidophilus* NRRL 4495 suşunun

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

45°C de en yüksek aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir.

Çalışmalar sonucunda araştırmacıların, farklı ortamlardan izole edilen bakteriler tarafından üretilen farklı enzimlerin, mikroorganizmaların izole edildiği ortamdaki pH ve sıcaklıkların üzerinde ve/veya altındaki pH ve sıcaklıklarda

maksimum aktivite gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Arcus ve ark. (2020). enzim. kaynak organizmanın doğal yaşam ortamıyla ilişkili olduğu sıcaklık ve pH'ta en iyi şekilde işlev gördüğünü bildirmişler ki buda bizim sonuçlarımızla uyumludur.

Tablo 3. ZD 22 ve ZD 34 izolatlarının farklı sıcaklık ve pH'daki β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesi

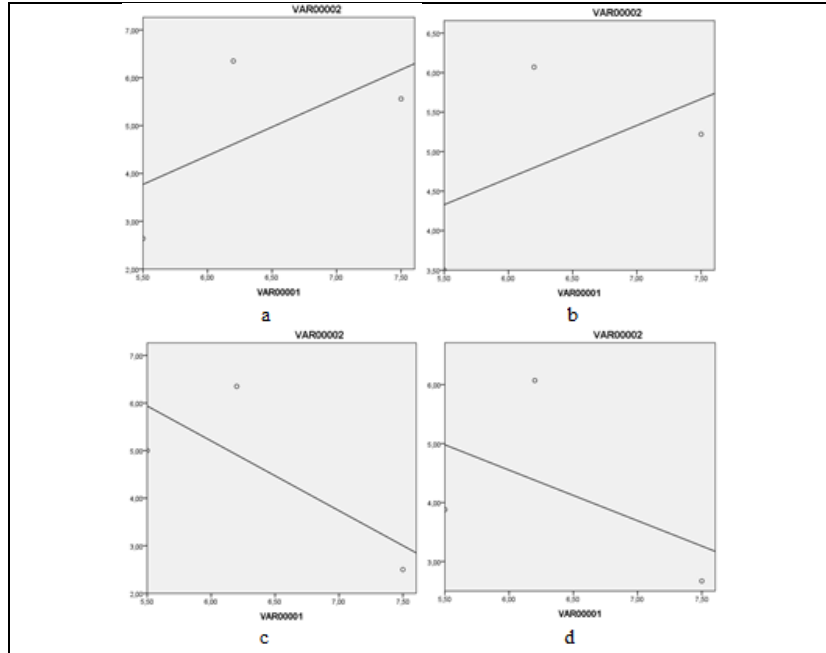
İzolat	pH	Spesifik Aktivite (U/mg)	Sıcaklık (°C)	Spesifik Aktivite (U/mg)
ZD 22	5.5	2.64±0.07	30	5.00±0.05
	6.2 (Kontrol)	6.35±0.00	37 (Kontrol)	6.35±0.00
	7.5	5.56±0.06	45	2.50±0.04
ZD 34	5.5	3.50±0.04	30	3.88±0.01
	6.2 (Kontrol)	6.07±0.02	37 (Kontrol)	6.07±0.02
	7.5	5.22±0.00	45	2.67±0.01

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Tablo 4. ZD 20 ve ZD 28 izolatlarının farklı pH ve sıcaklıklarda hücre içi/hücre dışı folat üretimi (μ g/L)

Bakteri	pH	Folat Üretimi (μ g/L)					
		Hücre içi			Hücre dışı		
		30°C	37°C	45°C	30°C	37°C	45°C
ZD 20	5.5	71.5±0.5	110±0.0	68.4±0.2	94.8±0.09	92.8±1.2	40.9±1.1
	6.2 (Kontrol)	108.9±0.0	124.2±1.2	70.7±1.1	91.1±0.1	104.4±0.0	77.6±0.6
	7.5	54.4±1.2	84.2±0.3	62.0±0.0	71.0±0.0	78.4±0.0	28.7±0.0
ZD 28	5.5	88.3±0.0	98.3±1.0	60.7±0.7	100.7±0.0	119.9±0.0	95.1±0.1
	6.2 (Kontrol)	96.2±0.2	104.1±0.2	58.7±1.2	104.8±0.0	121.0±0.0	86.4±0.2
	7.5	68.8±0.0	72.3±1.1	49.9±1.0	62.8±0.4	74.0±0.0	20.4±0.4

±: standart sapma şeklinde sunulmuştur.



Şekil 3. ZD 22 ve ZD 34 izolatlarının β -galaktozidaz spesifik enzim aktivitesinin farklı pH ve sıcaklık ile olan ilişkilerine ait korelasyon grafikleri

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

Probiyotik ve starter kültür olarak kullanılmaya potansiyeli olan LAB'nin folat üretim (özellikle ekstrasellüler) yeteneğine de sahip olması durumunda, bakteriler bağırsak mikrobiotasında avantajlı hale getirebilir. Hücre içi folat üretiminin yüksek olması bakterinin metabolik aktivitesi hakkında bilgi verirken, hücre dışı folat miktarının artması tüketilen gıdaların folat içeriğinin zenginliği hakkında fikir verecektir. Bu çalışmada, tavuk gastrointestinal sisteminden elde edilen 25 laktobasil bakterisinin folat üretim miktarları tespit edilmiş ve ZD20 izolatının 124.2 $\mu\text{g/L}$ ile en yüksek hücre içi folat üretimine, ZD34 suşunun ise 10.1 $\mu\text{g/L}$ ile düşük folat üretim kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. ZD28 (121.0 $\mu\text{g/L}$) ve ZD29 (4.2 $\mu\text{g/L}$) izolatları ise sırasıyla en yüksek ve en düşük hücre dışı folat üretim yeteneği sergilemişlerdir (Tablo 1). Çalışmada, laktobasil izolatlarının hücre içi ve hücre dışı folat üretimleri istatistiksel olarak $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı bir ilişki (Pearson Correlation katsayısı 0.979) bulunmuştur. Albano ve ark. (2020) 35 *Lactobacillus* suşunun hücre dışı ve hücre içi folat üretimini incelemişler ve en yüksek hücre dışı folat üretiminin *L. plantarum* VS513'te (72.99 ng/mL), en yüksek hücre içi folat üretiminin ise olarak *L. plantarum* VS166 (36.11 ng/mL) suşlarında gözlemlendiğini bildirmiştir. Başka bir çalışmada, araştırmacılar 12 LAB suşunun folat üretimini incelemişler ve yalnızca *L. plantarum* GSLP-7 (1.31 $\mu\text{g/mL}$) ile *L. plantarum* SKT109 (0.51 $\mu\text{g/mL}$) suşlarının folat üretme yeteneği gösterdiklerini rapor etmişlerdir (Zhang ve ark., 2020). Cucick ve ark. (2020) Brezilya keçi süt ürünlerinden izole ettikleri *L. plantarum* (16 cv) bakterisinin folat üretim miktarını 128 ng/mL olarak tespit etmişlerdir.

Folat üretimi büyüme kinetiği, kültür koşulları, besiyeri bileşimi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişim gösterebilmektedir (Saubade ve ark. 2017). Bu çalışmada, farklı sıcaklık (30, 37, 45) ve pH (5.5, 6.2, 7.0) koşullarının folat üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için hem hücre içi hem de hücre dışı yüksek folat üretimine sahip iki izolat (ZD20 ve ZD28) seçilmiştir. Her iki suş için yapılan istatistiksel analiz sonucunda farklı pH ve sıcaklıklarda hem

hücre içi hem de hücre dışı folat üretimleri arasında kayda değer bir korelasyon tespit edilememiştir. Her iki izolatta optimum gelişme koşullarında (pH 6.2 ve 37°C) geliştirildiğinde hem hücre içi hem de hücre dışı folat üretim miktarlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç

Bu çalışma kapsamında diğer çalışmalardan farklı olarak tavuk gastrointestinal sisteminden izole edilen laktobasilin hücre içi/hücre dışı folat üretimleri ile β -glukozidaz ve β -galaktozidaz enzim aktivitesi arasındaki ilişki incelenmiştir. İzolatların β -glukozidaz enzim aktiviteleri ile hücre içi folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.149) ve hücre dışı folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.189) arasında, ayrıca β -galaktozidaz enzim aktiviteleri ile hücre içi folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.168) ve hücre dışı folat üretimi (Pearson Correlation katsayısı 0.221) arasında korelasyon olmadığı tespit edilmiştir. Yüksek enzim aktivitelerine ve folat üretimine sahip olan izolatların fermente ürünlerin geliştirilmesinde starter kültür ve potansiyel probiyotik olarak kullanılabilme potansiyelleri de belirlendikten sonra endüstriyel üretimlerde kullanımları mümkün olabilecektir.

Kaynaklar

- Arcus, V. L., van der Kamp, M. W., Pudney, C. R., Mulholland, A. J. (2020) Enzyme evolution and the temperature dependence of enzyme catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 65:96-101. doi:10.1016/j.sbi.2020.06.001.
- Asanuma, D., Sakabe, M., Kamiya, M., Yamamoto, K., Hiratake, J., Ogawa, M., Kosaka, N., Choyke, P.L., Nagano, T., Kobayashi, H., Urano, Y. (2015) Sensitive beta-galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours *in vivo*. *Nat. Commun* 6:6463. doi: 10.1038/ncomms7463.
- Aswathy, R. G., Ismail, B., John, R. P., Nampoothiri, K. M. (2008) Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151:244-255. doi:10.1007/s12010-008-8183-6.
- Bailey, L. B., Stover, P. J., McNulty, H., Fenech, M. F., Gregory, J. F., Mills, J. L., Pfeiffer, C. M., Fazili, Z., Zhang, M., Ueland, P. M., Molloy,

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- A. M., Caudill. M. A., Shane. B., Berry. R. J., Bailey. R. L., Hausman. D. B., Raghavan. R., Raiten. D. J. (2015) Biomarkers of nutrition for development-folate review. *J Nutr.* 145:7.1636-1680. doi: <https://doi.org/10.3945/jn.114.206599>.
- Bationo. F., Humblot. C., Songré-Ouattara. L. T., Hama-Ba. F., Merrer. M. L., Chapron. M., Kariluoto. S., Hemery. Y. M. (2020) Total folate in West African cereal-based fermented foods: Bioaccessibility and influence of processing. *J Food Compos Anal.* 85:103309. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103309>.
- Bentahar. J., Doyen. A., Beaulieu. L., Deschênes. J. S. (2019) Acid whey permeate: An alternative growth medium for microalgae *Tetrademus obliquus* and production of β -galactosidase. *Algal Res.* 41:101559. doi: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101559>.
- Bi Y, Zhu C, Wang Z, Luo H, Fu R, Zhao X, Zhao X, Jiang L (2019) Purification and characterization of a glucose-tolerant β -glucosidase from black plum seed and its structural changes in ionic liquids. *Food Chem.* 274. 422-428 8. [10.1016/j.foodchem.2018.09.007](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.007).
- Carević. M., Vukašinović-Sekulić. M., Grbavčić. S., Stojanović. M., Mihailović. M., Dimitrijević. A., Bezbradica. D. (2015) Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. *Hem. Ind.* 69(3):305-312. doi: [10.2298/HEMIND140303044C](https://doi.org/10.2298/HEMIND140303044C).
- Chanalia. P., Gandhi. D., Attri. P., Dhanda. S. (2018) Purification and characterization of β -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. *Bioorg. Chem.* 77:176-189. doi: [10.1016/j.bioorg.2018.01.006](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.01.006).
- Chen. G. Y., Zhang. H., Yang. F. Q. (2021) A simple and portable method for β -Glucosidase activity assay and its inhibitor screening based on a personal glucose meter. *Anal Chim Acta.* 1142:19-27.
- Choi. Y. B., Kim. K. S., Rhee. J. S. (2002) Hydrolysis of soybean isoflavone glucosides by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Lett.* 24:2113-2116. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1021390120400>.
- Cinar Acar. B., Yuksekdag. Z. (2023) Beta-glycosidase activities of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. and the effect of different physiological conditions on enzyme activity. *NEsciences.* 8(1):1-17. doi: [10.28978/nesciences.1223571](https://doi.org/10.28978/nesciences.1223571).
- Cucick. A. C. C., Gianni. K., Todorov. S. D., LeBlanc. A. M., LeBlanc. J., Franco. B. D. G. M. (2020) Evaluation of the bioavailability and intestinal effects of milk fermented by folate producing lactic acid bacteria in a depletion/repletion mice model. *J. Funct. Foods.* 66:103785. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103785>.
- de Ovalle. S., Brena. B., González-Pombo. P. (2021) Influence of beta glucosidases from native yeast on the aroma of Muscat and Tannat wines. *Food Chem.* 346:128899.
- Donnelly. J. G. (2001) Folic acid. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 38(3):183-223. doi: <https://doi.org/10.1080/20014091084209>.
- Gu. K., Xu. Y., Li. H., Guo. Z., Zhu. S., Zhu. S., Shi. P., James. T. D., Tian. H., Zhu. W. H. (2016) Real-time tracking and *in vivo* visualization of beta-galactosidase activity in colorectal tumor with a ratiometric near-infrared fluorescent probe. *J. Am. Chem. Soc.* 138:5334-5340. doi: [10.1021/jacs.6b01705](https://doi.org/10.1021/jacs.6b01705).
- Gül Güven. R. (2011) Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi.* 9(1): 1-10.
- Han X, Qing X, Yang S, Li R, Zhan J, You Y, Huang W (2021) Study on the diversity of non-*Saccharomyces* yeasts in Chinese wine regions and their potential in improving wine aroma by β -glucosidase activity analyses. *Food Chem.* 360:129886 9. [10.1016/j.foodchem.2021.129886](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129886).
- Horne. D. W., Patterson. D. (1988) *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. *Clin Chem.* 34(11): 2357-9.
- Ismail. S. A. A., El-Mohamady. Y., Helmy. W. A., Abou-Romia. R., Hashem. A. M. (2010) Cultural condition affecting the growth and production of a β -galactosidase by *Lactobacillus acidophilus* NRRL 4495. *J. Basic Appl. Sci.* 4(10):5051-5058.
- Juers. D. H., Matthews. B. W., Huber. R. E. (2012) LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *The Protein Society.* 21:1792-1807. doi: <https://doi.org/10.1002/pro.2165>.
- Kabir. M. F., Ju. L. K. (2023) On optimization of enzymatic processes: Temperature effects on activity and long-term deactivation kinetics. *Process Biochem.* 130:734-746.

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.05.031>.
- Kara, F. (2004) Release and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus plantarum*. M.C. Thesis. Department of Biotechnology. Middle East Technical University. 89p.
- Kayukawa, C. T. M., Oliveira, M. A. S., Kaspchak, E., Sanchuki, H.B.S., Lucigarashi-Mafra, L., Mafra, M. R. (2020) Quillaja bark saponin effects on *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase activity and structure. *Food Chem.* 303:125388. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125388>.
- Kılıc, Y., Yuksekdog, Z., Yuksekdog, H. (2014) Beta galactosidase enzyme activities of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus. *The Journal of Food*. 39(4):211-218. doi:10.5505/gida.29491.
- Kim, E. J., Kumar, R., Sharma, A., Yoon, B., Kim, H. M., Lee, H., Hong, K. S., Kim, J. S. (2017) In vivo imaging of beta-galactosidase stimulated activity in hepatocellular carcinoma using ligand-targeted fluorescent probe. *Biomater.* 122:83-90. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.01.009.
- Kolev, P., Rocha-Mendoza, D., Ruiz-Ramírez, S., Ortega-Anaya, J., Jiménez-Flores, R., García-Cano, I. (2022) Screening and characterization of β -galactosidase activity in lactic acid bacteria for the valorization of acid whey. *JDS Communications*. 3(1):1-6. doi:<https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0145>.
- Lee, H. W., Juvekar, V., Lee, D. J., Kim, S. M., Kim, H. M. (2021) Highly stable red-emissive ratiometric probe for monitoring β -galactosidase activity using fluorescence microscopy and flow cytometry. *Anal. Chem.* 93:44. 14778-14783. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c03453>.
- Lian Y., Yuan X., Wang Y., Wei L (2022) Highly sensitive visual colorimetric sensor for xanthine oxidase detection by using MnO₂-nanosheet-modified gold nanoparticles. *Spectrochim Acta A*. 276:121219.
- Liu, Z., Liu, S., Gao, D., Li, Y., Tian, Y., Bai, E. (2022) An optical sensing platform for beta-glucosidase activity using protein-inorganic hybrid nanoflowers. *J. Fluoresc.* 32:669-680. doi:10.1007/s10895-021-02859-1.
- Lorn, D., Nguyen, T. K. C., Ho, P. H., Tan, R., Licandro, H., Waché, Y. (2021) Screening of lactic acid bacteria for their potential use as aromatic starters in fermented vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 350:109242. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109242>.
- Mahara, F. A., Nuraida, L., Lioe, H. N. (2019) Fermentation of milk using folate-producing lactic acid bacteria to increase natural folate content: A Review. *JABR*. 6(4):129-136. doi:10.29252/JABR.06.04.01.
- Mattarelli, P., Biavati, B., Holzapfel, W. H., Wood, B. J. B. (2018) The Bifidobacteria and related organisms: Biology, taxonomy, applications. Elsevier, London, United Kingdom Academic Press.
- Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N., Ueda, S. (1994) Solubilization of a novel isoflavone glucoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *J. Biosci. Bioeng.* 77:439-441. doi:10.1016/0922-338X(94)90021-3.
- Marazza, J. A., Garro, M. S., Giori, G. S. (2009) Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. *Food Microbiol.* 26:333-339. doi:10.1016/j.fm.2008.11.004.
- Michlmayr, H., Schumann, C., Barreira Braz da Silva, N. M., Kulbe, K. D., del Hierro, A. M. (2010) Isolation and basic characterization of a β -glucosidase from a strain of *Lactobacillus brevis* isolated from a malolactic starter culture. *J. Appl. Microbiol.* 108:500-559.
- Ningtyas, D. W., Hati, S., Prakash, S. (2021) Bioconversion and bioaccessibility of isoflavones from sogurt during *in vitro* digestion. *Food Chem*. 343:128553.
- Nguyen, T. H., Splechna, B., Krasteva, S., Kneifel, W., Kulbe, K. D., Divne, C., Haltrich, D. (2007) Characterization and molecular cloning of a heterodimeric β -galactosidase from the probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* R22. *FEMS Microbiol. Lett.* 269:136-144.
- Palmer, T., Bonner, P. L. (2007) Enzymes Biochemistry. Biotechnology. Clinical Chemistry Book Second Edition. Woodhead Publishing Limited. ISBN: 978-1-904275-27-5
- Pereira, L. M. S., Bernardi, A. V., Gerolamo, L. E., Pedersoli, W. R., Carraro, C. B., Silva, R. N., Uyemura, S. A., Dinamarco, T. M. (2023) Characterization of a new glucose-tolerant gh1 β -glycosidase from *Aspergillus fumigatus* with transglycosylation Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 24(5):4489. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms24054489>.

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- Preedy, V. R. (2013) B Vitamins and Folate. The Royal Society of Chemistry (ed). Food and Nutritional Components in Focus. Cambridge. UK. 10.1039/9781849734714.
- Perez-Martín, F., Sesena, S., Izquierdo, P. M., Martín, R., Palop, M. L. (2012) Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(4):1423-1432. doi:10.1007/s11274-011-0942-9.
- Saqib, S., Akram, A., Halim, S.A., Tassaduq, R. (2017) Sources of β -galactosidase and its applications in food industry. *3 Biotech.* 7:79. doi:10.1007/s13205-017-0645-5.
- Saubade, F., Hemery, Y. M., Guyot, J. P., Humblot, C. (2017) Lactic acid fermentation as a tool for increasing the folate content of foods. *Crit Rev Food Sci.* 57(18):3894-3910. doi:10.1080/10408398.2016.1192986.
- Shaikhan, B. A., Güven, K., Bekler, F. M., Acer, Ö., Güven, R. G. (2020) A highly inducible β -galactosidase from *Enterobacter* sp. *J. Serb. Chem. Soc.* 85(5):609-622. doi:https://doi.org/10.2298/JSC190711141S.
- Sheldon, R. A., Brady, D. (2022) Green chemistry, biocatalysis, and the chemical industry of the future. *ChemSusChem.* 15(9): e202102628. doi:https://doi.org/10.1002/cssc.202102628.
- Singh, G., Verma, A. K., Kumar, V. (2016) Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. *3 Biotech.* 6:3. doi: 10.1007/s13205-015-0328-z.
- Sinha, S., Datta, M., Datta, S. (2021) A glucose tolerant β -glucosidase from *Thermomicrobium roseum* that can hydrolyze biomass in seawater. *Green Chem.* 23:7299-7311.
- Son, S. H., Jeon, H. L., Yang, S. J., Sim, M. H., Kim, Y. J., Lee, N. K., Paik, H. D. (2018) Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on β -glucosidase activity. *Food Sci. Biotechnol.* 27(1):123-129. doi:https://doi.org/10.1007/s10068-017-0212-1.
- Srivastava, N., Rathour, R., Jha, S., Pandey, K., Srivastava, M., Thakur, V. J., Sengar, R. S., Gupta, V. K., Mazumder, P. B., Khan, A. F., Mishra, P. K. (2019) Microbial beta glucosidase enzymes: Recent advances in biomass conversion for biofuels application. *Biomol.* 9:220. doi:10.3390/biom9060220.
- Strahsburger, E., Lacey, M. L., Marotti, I., DiGioia, D., Biavati, B., Dinelli, G. (2017) *In vivo* assay to identify bacteria with β -glucosidase activity. *Electron. J. Biotechnol.* 30:83-87. doi:https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.010
- Sumengen, M., Dincer, S., Aysenur Kaya, A. (2013) Production and Characterization of Phytase from *Lactobacillus plantarum*. *Food Biotechnol.* 27:105-118.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Tijsseling, L., Hoefnagel, M. H. N., Hugenholtz, J. (2003a) Effect of cultivation conditions on folate production by lactic acid bacteria. *AEM.* 69(8):4542-4548. doi:10.1128/AEM.69.8.4542-4548.2003.
- Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., de Vos W. M., Hugenholtz, J. (2003b). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *AEM.* 69(6):3069-3076. doi:10.1128/AEM.69.6.3069-3076.2003.
- Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A.T., Arda, N. (2008) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (Biyogem) Yayın, Nobel Tıp Kitapevleri, 345s.
- Tsangalis, D., Ashton, J. F., McGill, A. E. J., Shah, N. P. (2002) Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by β -glucosidase producing Bifidobacteria. *Food Microbiol. Saf.* 67:8.
- Vasudha, M., Prashantkumar, C. S., Bellurkar, M., Kaveeshwar, V., Devaraja Gayathri, D. (2023) Probiotic potential of β -galactosidase-producing lactic acid bacteria from fermented milk and their molecular characterization. *Biomed. Rep.* 18(3):23. doi:10.3892/br.2023.1605.
- Wang, F., Li, Y., Han, Y., Ye, Z., Wei, L., Luo, H., Xiao, L. (2019) Single-particle enzyme activity assay with spectral-resolved dark-field optical microscopy. *Anal Chem.* 91:6329-6339 2.
- Wu Y, Li Z, Shi M, Yuan K, Meng H, Qu L, Li Z (2021) Programmable DNzyme computing for specific *in vivo* imaging: intracellular stimulus-unlocked target sensing and signal amplification. *Anal Chem* 93:12456-12463.
- Yañez-Neco, C. V., Cervantes, F. V., Amaya-Delgado, L., Ballesteros, A. O., Plou, F. J., Arrizon, J. (2021) Synthesis of $\beta(1 \rightarrow 3)$ and $\beta(1 \rightarrow 6)$ galactooligosaccharides from lactose and whey using a recombinant β -galactosidase from *Pantoea anthophila*. *Electron. J.*

Laktobasil Cinsi Bakterilerin Hücre İçi ve Hücre Dışı Folat Üretimi ile β -Glukozidaz ve β -Galaktozidaz Enzim Üretimleri Arasındaki İlişki

- Biotechnol.* 49:14-21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.10.004>
- Yao. B., Zhao. J., Ding. S., Giel. M. G., Zhang. G., Ding. D., Tang. Y., Weng. Z. H., Hong. Y. (2023) A novel red-emitting aggregation-induced emission probe for determination of β -glucosidase activity. *Biomater.* 295:122046.
- Yuan. X., Zhang. H., Cao. H., Mao. G., Wei. L. (2022) Determination of β -glucosidase activity using single-particle enumeration with Au@CeO₂ nanoparticles. *Microchim. Acta.* 189:480. doi:<https://doi.org/10.1007/s00604-022-05580-3>.
- Yuksekdag. Z., Cinar Acar. B., Aslim. B., Tukenmez. U. (2018) β -Glucosidase activity and bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones by potential probiotic bacteria. *Int. J. Food Prop.* 20:S3.2878-2886. doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1382506>.
- Yuksekdag. H., Yuksekdag. Z. (2021) Beta galactosidase activity in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ZN541 and *Streptococcus thermophilus* Z1052 strains and optimization. *The Journal of Food.* 46(6):1331-1342. doi:10.15237/gida.GD21059.
- Zacharof. M. P., Lovitt. R. W., Ratanapongleka. K. (2010) The importance of Lactobacilli in contemporary food and pharmaceutical industry A review article. Proceedings of 2010 International Conference on Chemical Engineering and Applications. 3-18 ISBN: 978-1-84626-023-0.
- Zhang. W., Wang. C., Huang. C. Y., Yu. Q., Liu. H. C., Zhang. C. W., Pei. X. F., Xu. X., Wang. G. Q. (2012) Analysis of β -galactosidase production and their genes of two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.* 34(6):1067-1071.



Research Article

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

Nazan KOLUMAN¹, Athanasios RAGKOS², Serap GÖNCÜ^{1*}

ABSTRACT

PASTINNOVA is one of the approved projects by the PRIMA (Partnership for Research and Innovation in the Mediterranean) foundation of the European Union HORIZON 2020 program. The general target of PASTINNOVA is to increase the resilience of small-scale farms producing in rural areas under the pressure of changing climatic conditions, to improve production and marketing opportunities with innovative approaches, and to create sustainable business and organizational models for the economic empowerment of rural women. Living Laboratory (LL) is an open, user-oriented system whose overall scope is principle-based, based on the discovery and discovery of tangible objects in living communities. Within the scope of the project, we are also starting our efforts to establish the first Regional Living Laboratory, which is highly preferred in the international disciplines, which will adapt to Mediterranean animal husbandry. Living Laboratories are application-oriented networks where all relevant stakeholders are involved, where problems are identified, new solutions are developed, and which facilitate and encourage the implementation of open, collaborative, innovative practices in pastoral livestock production. In this study the contributions of stakeholders, Identification of problems and first meeting outputs of the 1st RLL meeting in Adana-Turkey will be presented.

Key words: PASTINNOVA Project, Living Lab, Pastoral Mobility, Rural Life, Turkey

PASTINNOVA Projesi, Sürdürülebilir Pastoral Hareketlilik Yaşam Laboratuvarı: Türkiye Vaka Çalışması

ÖZ

PASTINNOVA, Avrupa Birliği HORIZON 2020 programının PRIMA vakfı tarafından onaylanan projelerinden biridir. PASTINNOVA'nın genel hedefi, değişen iklim koşullarının baskısı altında kırsal alanlarda üretim yapan küçük ölçekli çiftliklerin dayanıklılığını artırmak, yenilikçi yaklaşımlarla üretim ve pazarlama olanaklarını geliştirmek ve kırsal kesimdeki kadınların ekonomik olarak güçlendirilmesi için sürdürülebilir iş ve organizasyon modelleri oluşturmaktır. Yaşayan Laboratuvarlar (LL), genel kapsamı ilke temelli, yaşayan topluluklarda somut nesnelerin keşfedilmesi ve ortaya çıkarılmasına dayanan açık, kullanıcı odaklı bir sistemdir. Proje kapsamında Akdeniz hayvancılığına uyum sağlayacak, uluslararası disiplinlerde çok tercih edilen ilk Bölgesel Yaşayan Laboratuvarı kurmak için çalışmalarımıza da başlıyoruz. Yaşayan Laboratuvarlar, ilgili tüm paydaşların dahil olduğu, sorunların tespit edildiği, yeni çözümlerin geliştirildiği, pastoral hayvancılıkta açık, işbirliğine dayalı, yenilikçi uygulamaların hayata geçirilmesini kolaylaştıran ve teşvik eden uygulama odaklı ağlardır. Bu çalışmada, paydaşların katkıları, sorunların tanımlanması ve Adana-Türkiye'deki 1. Yaşayan Laboratuvar toplantısının ilk toplantı çıktıları sunulacaktır.

Anahtar kelimeler: PASTINNOVA Projesi, Living Lab, Pastoral Hareketlilik, Kırsal Yaşam, Türkiye

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-9888-1755, 0000-0002-7247-6118, 0000-0002-0360-2723

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 08.02.2024

Kabul Tarihi: 28.05.2024

¹ Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Cukurova University, Adana

² Department of Agricultural Economics, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki

*E-posta: serapgoncu66@gmail.com

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

Introduction

The pastoral system is a complex structure in which breeders produce livestock using natural resources within their cultural values derived from traditions (Caballero et al., 2009). Livestock activities carried out in the context of pastoralism are characterized by extensive grazing on natural pastures, but also use of pastures and cultivated lands, the variety of species and native breeds, livestock husbandry systems (López-i-Gelats et al., 2016), and different degrees of use of labour. Pastoral systems provide a wide range of ecosystem services (ES) and play multiple roles towards sustainable and inclusive development (D'Ottavio et al., 2018). The socio-economic role of pastoralists is related to the sustainability of livelihoods in mountain/marginal/island areas for centuries and is still an important source of income and employment, even in combination with other activities (Ragkos et al., 2020). Environmental roles result from being adapted to local conditions and thus making efficient use of natural resources. Good grazing practices in pastoral systems play an important role in grassland management, biodiversity, landscape structure and climate change mitigation (Caballero et al., 2009; Vagnoni and Franca, 2018). The cultural heritage of pastoralism characterizes the regions: Traditional ecological knowledge, farm and land management; customs, traditions and norms; processing. Pastoralism is included in the Representative List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity (Greece, Italy, Austria, Turkey). Last but not least, pastoral food has many of the characteristics that the EU Circular Economy Action Plan calls for (high-quality, functional, safe, efficient and affordable) (Budimir et al., 2018). The general target of PASTINNOVA is to increase the resilience of small-scale farms producing in rural areas under the pressure of changing climatic conditions, to improve production and marketing opportunities with innovative approaches, and to create sustainable business and organizational models for the economic empowerment of rural women. Living

Labs (LL) is an open, user-oriented system whose overall scope is principle-based, based on the discovery and discovery of tangible objects in living communities. Within the scope of the project, we are also starting our efforts to establish the first Regional Living Lab, which is highly preferred in the international disciplines, which will adapt to Mediterranean animal husbandry.

When the literature on living laboratories is examined; Folstad (2008) conducted a study to determine the theoretical foundations, processes, methods and perspectives of living laboratories. While Franz (2015) offers a more social-centered perspective on living laboratories, Schuurman et al. (2015) concluded that research and applications related to living laboratories are still at a nascent stage. Leminen et al. (2017) conducted a study to understand the emergence of the living laboratory concept. McLoughlin et al. (2018) bibliometric analysis of living laboratories, Westerlund et al. (2018) modeled living laboratories.

Based on the theory of 'Living Laboratories' (www.enoll.org), a joint network on "Pastoral actors and Value Chains of Pastoral products (VCP)" will be established with the aim of co-creating innovative solutions for farmer organizations, farm management and VCP through the integration of the needs, capacities and experiences of actors (e.g. farmers, entrepreneurs, producers, retailers, policy makers, researchers, consumers). Therefore, PASTINNOVA lies in the core of sustainable rural development. In this study the contributions of stakeholders, identification of problems and first meeting outputs of the 1st RLL meeting in Adana-Turkey will be presented.

Material and Methods

In this study, a living laboratory application will be organized and the results will be discussed with the aim of introducing innovative solutions in farm management in farmer organizations through the integration of the needs, capacities

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

and experiences of farmers, entrepreneurs, producers, retailers, policy makers, researchers and consumers.

In terms of the complex challenges that exist in real life, it is very difficult for a single actor to find the right solution.

By co-operating with end-users and other actors and finding common solutions, complexity and uncertainty can be reduced and the chances of finding a solution can be increased.

Research has shown that LLs with network structures based on extensive knowledge, information exchange and collaboration between multiple actors lead to radical innovation, whereas LLs with centralized network structures achieve more marginal innovative developments (Leminen, 2017).

The concept of LL was first proposed by Prof. William Mitchell of the MIT Media Lab as "a research methodology for sensing, sampling, validating and refining complex solutions in multiple and emerging real-life contexts".

Living Lab (LL) is a new approach that aims to produce innovative solutions with the participation of users in the real-life environment of scientific or technological research, experiments and measurements.

Unlike conventional laboratories, a Living Lab (LL) operates in real-life, user-orientated conditions. The physical and/or organizational boundaries of a Living Lab are defined according to its purpose, scope and content.

The Living Lab is still used for the development of IT and design related products and services by testing them with real users in a real life environment.

Some basic features of how a living laboratory should be are as follows:

The living laboratory should work with real users in a real life environment. In this way, user needs and expectations can be accurately determined and solutions can be designed accordingly.

The living laboratory should work with a multidisciplinary approach. In this way, different perspectives, knowledge and skills can be brought together and more creative and effective solutions can be produced.

The living laboratory should ensure the participation of stakeholders. In this way, the views, experiences and contributions of stakeholders can be obtained and the applicability and sustainability of solutions can be increased.

The living laboratory should be in a continuous learning and development process. In this way, solutions are tested, evaluated and improved. In addition, new needs, opportunities and problems are identified and new solutions are developed accordingly.

The Lab aims to ensure the participation of a large number of participants and all stakeholders in all stages of the development and innovation life cycle by sharing ideas and experiences in an effective and efficient manner

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

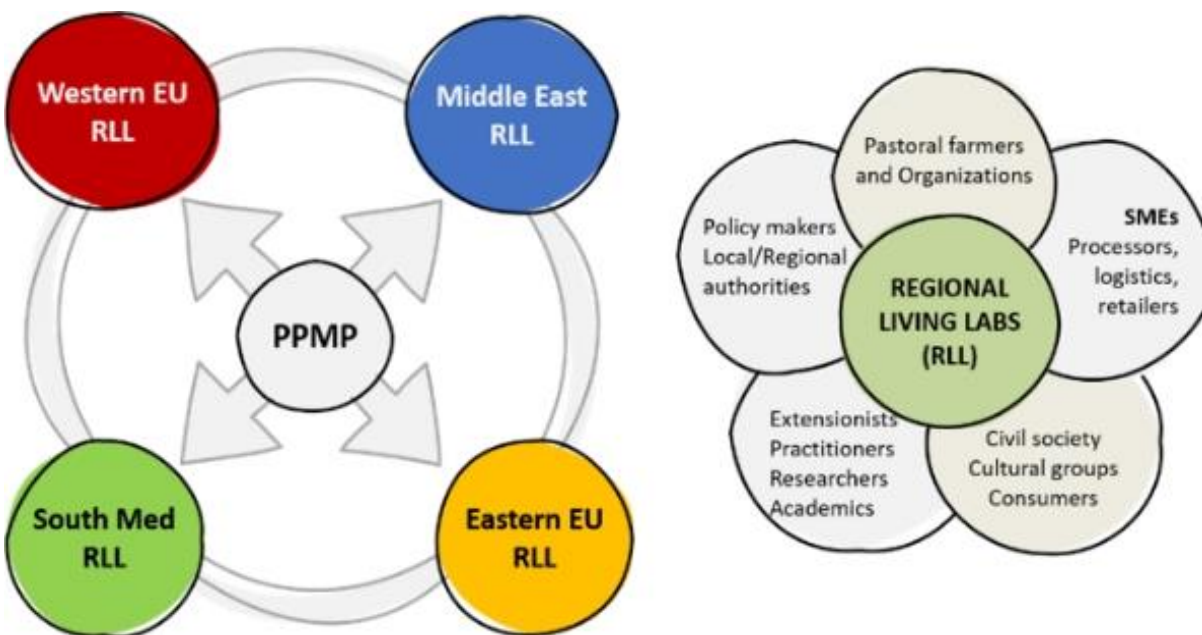


Figure 1. Participatory Platform for Mediterranean Pastoralism" (PPMP) and four Regional LLs (RLLs)

The joint network on "Pastoral actors and VCP" will be expressed through a "Participatory Platform for Mediterranean Pastoralism" (PPMP) and four Regional LLs (RLLs) (Figure 1), grouping countries from regions with common economic, socio-political, cultural and environmental challenges and geo-climatic affinities in their pastoral systems. The PPMP will coordinate the pooling of existing knowledge and other pastoral resources; serve as a nexus enabling connectivity, communication, co-learning and information flow between RLLs; and monitor the progress of RLL activities. RLLs will undertake a co-creation approach by co-designing the implementation, evaluation and characterization of innovative solutions, while contributing to the validation of results, outputs and strategies. Selected solutions will be tested and implemented in small-scale real-life applications and evaluated for their sustainability (economic, social, environmental). There will be

a particular focus on the inclusion of vulnerable groups (e.g. women, young farmers and migrant workers).

The following steps were followed in the living laboratory implementation;

1. The roles, responsibilities and expectations of stakeholders (farmer organizations through the integration of the needs, capacities and experiences of farmers, entrepreneurs, producers, retailers, policy makers, researchers and consumers) and stakeholders were clarified.
2. The purpose, scope and methodology of the living laboratory study were explained to the participants. The living laboratory was defined with its subject, target group, research questions and hypotheses. In addition, necessary information was given about the compliance of the living laboratory study with ethical rules and legal legislation

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

3. The tools, methods, data and analyses to be used during the living laboratory study were planned.

4. In addition, during the living laboratory study, the needs, expectations and experiences of the participants were observed and their opinions were recorded. The solutions produced as a result of the living laboratory study were discussed with other participants, evaluated and tried to be improved.

5. The opinions, suggestions, data and analyses obtained in the living laboratory study were systematically reported and the findings, results and suggestions were shared with the stakeholders.

A total of 16 stakeholders attended the first meeting. Cukurova University was the management unit and project stakeholders, Adana Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, Sarıçam Directorate of Agriculture and Forestry, Adana Breeding Sheep and Goat Breeders' Association, entrepreneurs on related IBM, Animal breeders, Women's Cooperatives producing products for related IBM and the press attended the meeting. A survey was organized to identify the problems and outputs of the Regional Living Lab of Turkey.

Result and Discussions

Animal proteins such as meat, milk and their products have a very important place in the healthy nutrition of humans. People need nutrition every day. The strategic importance of food supply all over the world has once again come to the fore with the Covid outbreak. During the Covid restrictions, apart from health services, food production and shipment provided uninterrupted service. However, producing these in healthy and nature-friendly conditions is another important aspect of the issue. Sustainable and nature-friendly production models are much

more questionable. Sheep and goat breeding is important in a wide range of products such as meat, milk and dairy products such as yogurt, ice cream etc, wool, hair and leather, and textile sector products. Foods obtained from sheep and goats have a vital importance in human nutrition. This sector is extremely important in terms of cheap and accessible supply of animal protein and balanced and adequate nutrition of societies. Sheep and goat husbandry, which is known as one of the first sources of livelihood for mankind on earth, has maintained its place in the agricultural economy to a great extent throughout history and today it provides job opportunities for millions of people worldwide. For this reason, small ruminant breeding is more prominent. However, this branch of animal husbandry, which is carried out in the form of small-scale and nomadic animal husbandry and mostly based on pasture, also has various difficulties.

In accordance with the working principle of the living lab, a one-day meeting was held based on bringing together different segments that are involved in sheep and goat breeding or involved in this issue in one way or another, each group expressing their own problems and seeking solutions to the problems.

Participants who took the floor at the meeting first of all expressed the problems of the sector they represent. Accordingly, the problems of women's cooperatives are listed below;

- Organizational problems; It is very difficult to find the right teammate to build a cooperative, cooperative members leave the president alone, the partners entering the cooperative are not interested in any other line of business and live a life solely dependent on the income of the cooperative, which will increase productivity

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

- Qualified personnel are required to maintain the traditional taste in traditional product production
- Volatile input prices have a negative impact on price policy
- High tax policies
- High labor costs
- Marketing problems
- Legal procedures for the produced product are difficult, time consuming and costly.

The problems encountered by the participants attending the meeting and representing the breeders during breeding are listed below;

- Animal health issues; Veterinary, vaccination and medicine costs are too high
- Input prices are very high and access to quality inputs is very difficult
- Roads leading to pastures have been closed by Forestry Enterprises, we cannot go out of villages
- The younger generation is not interested in animal husbandry and are migrating to the cities,
- We have problems in reaching the market, but when we can reach it, we have no problem in selling our products
- When we go up to the springs, we have problems with storing what we produce, there used to be colder and snowier areas, but not anymore
- We used to walk while migrating to the highlands, but now our roads are closed so we have to hire vehicles and the cost is very high.

- The support provided is insufficient
- Small scale producer competition of chain markets.

The sector representative, who processes and markets animal products and owns a brand in this field, stated the problems related to him as follows;

- Quality problems in goat milk supply (hand milking errors, lack of cold chain, transportation losses, mixed milk usage problems, seasonal changes in goat milk production)

- High input costs; fuel, energy etc.
- Lack of hygiene and record keeping in farm
- Exportation problems to EU

Provincial and district representatives of the Ministry of Agriculture and Forestry participated in the meeting and expressed the problems related to the administrative and official part of the sector. These are;

- Small producers have very limited market possibilities
- Organization, product diversity and branding problems in women's cooperatives
- Lack of know-how and new technology (cost etc.)
- Subsidies are not used correctly
- Unable to produce healthy data due to lack of record keeping
- Low interest in training and extension activities
- Not enough interest in support to encourage the younger generation.

After the meeting, an 8-question questionnaire on the views of the participants about RLL was

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

administered to collect data on the effectiveness of the study.

Considering Turkey's geographical structure and extensive pastures, it is seen that Turkey has a significant potential for low-cost and high quality animal husbandry. Most of the pastures in the country have low productivity and are more suitable for small ruminant husbandry (Alkan ve ark. 2013; Daşkiran et al., 2018). Especially sheep and goat breeding is the most cost-effective animal husbandry in the country. Small ruminant breeding has a special importance in the Turkish economy. Sheep and goats account for 24.75 per cent of total meat production, 12.35 per cent of milk production and 63.18 per cent of leather production.

Although Turkey is one of the leading countries in the world in terms of ovine livestock, it is far from meeting the expectations in terms of yield per animal. However, the ecological conditions of our country are suitable for ovine breeding (Bingöl et al., 2013; Daşkiran et al., 2018). Revenues from ovine husbandry include the sale of livestock, fleece and hair, raw milk, butter and cheese (Karaca et al., 1990; Aydın and Keskin, 2018; Bebek and Keskin, 2018). Small ruminant farming in Turkey has an extensive structure with a population consisting mostly of low-yielding indigenous breeds, feeding conditions mainly based on grazing and production with limited inputs (Ertuğrul et al., 2010; Karagöl and Keskin, 2018; Gül et al., 2022). These characteristics of the sector can be added to the fact that the enterprises are small and undersized, input supply, product marketing and evaluation opportunities are inadequate, accordingly, the producers receive a low share from the market price, and production is largely carried out on a subsistence basis (Karaca and Kaymakçı, 1994; Aydın and Keskin, 2018).

Living Labs offer important opportunities to different segments working in this field by providing learning experiences for processes ranging from farm conditions to marketing in animal husbandry for problem identification and solution seeking. In addition to the results of the living lab study organized in this study, questions were asked to evaluate the study and the results obtained were summarized in the table. The principles of "user focus" and "co-production" lie at the basis of Living Laboratory's governance approach (Memiş and Küçük Bayraktar, 2020).

Feedback of stakeholders about the organized RLL is given Table 1.

Table 1. Feedback of stakeholders about the organized RLL

Questions	Frequency (%)	
	Yes	No
Do you know about LL before	18	82
Do you learn about LL after this meeting	82	18
Is this meeting useful for you?*	82	18
Do you like the meeting hall?	100	0
Do you like promotional materials?	100	0
Was it difficult for you to participate this meeting	40	60

As seen in Table 1, many participants stated that they were not aware of the living laboratory and only learned about it after the meeting. At the end of the RLL meeting in Turkey, the participants expressed that they were looking forward to sharing our experiences with other partners,

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

finding solutions to our difficulties and learning more about innovative methods for milk processing.

Conclusions

The point reached in recent years requires the inclusion of all stakeholders in the solution process for the solution in animal husbandry. The most important tool in this regard is living laboratory studies. Although living laboratories are suitable for involving stakeholders in the process, the interaction between animal husbandry and living laboratories has not been sufficiently emphasized in the literature. This paper discusses the necessity of adopting a living labs approach as a solution to the challenges of stakeholder engagement in smart city governance. In this way, the study is expected to contribute to the ongoing debate on what living laboratories should be.

Çukurova University proposed two Innovative Business Models (IBMs) for the goat breeding sector as part of the PASTINNOVA project. In this study, sector representatives gathered to discuss current problems and potential solutions, compare their own experiences with those of other partners, and exchange knowledge. During the meetings, sector representatives thoroughly addressed the challenges they face in goat breeding, examined best practices implemented in different geographical regions, and engaged in intensive discussions on sustainability, efficiency, and innovation. Through this collaborative effort, participants gained a broader perspective on the sector's issues, equipping them with the knowledge and experience to play a more active role in the upcoming Regional Living Laboratories' meetings, organized as clusters. This engagement is expected to contribute to the development of more effective and targeted solutions within the goat breeding sector.

Acknowledgment

This paper is supported by the PRIMA program under grant agreement No 2113, project “PASTINNOVA - Innovative models for sustainable future of Mediterranean pastoral systems”. The PRIMA program is supported by the European Union.

References

- Alkan İ., Kandemir Ç., Ünal H B & Taşkın, T.,2013. Küçükbaş yetiştiriciliğinde barınak yeri ve tipinin seçimi. Tarımsal Araştırma Yayın ve Eğitim Koordinasyonu (TAYEK), 2013 Yılı Hayvancılık Bölge Grup Toplantısı, 4-7 Kasım, Çanakkale, s. 1-9
- Memiş, L., and Küçük Bayraktar, H., 2020. Akıllı Kentler Ve Yaşam Laboratuvarları (Living Labs): Başakşehir Yaşam Laboratuvarı Örneğinde Bir İnceleme. Yıl 2020, Cilt: 16 Sayı: 4, 954 - 975,
- Bingöl, M., Yılmaz, A., Daşkiran, İ., M., Vural, M., 2013. Doğu Anadolu Bölgesinde organik koyun yetiştiriciliği ve geliştirme olanakları. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 2(1), 98108, 2013.
- Budimir K., Trombetta M. F., Francioni M., Toderi M. and D'Ottavio P., 2018. Slaughter performance and carcass and meat quality of Bergamasca light lambs according to slaughter age. In: Small Ruminant Research, 164, 1-7.
- Caballero R., Fernandez-Gonzalez F., Badia R. P., Molle G., Roggero P. P., Bagella S., D'Ottavio P., Papanastasis V. P., Fotiadis G., Sidiropoulou A. and Ispikoudis, I., 2009. Grazing systems and biodiversity in Mediterranean areas: Spain, Italy and Greece. In: Pastos, 39(1), 9-154.
- Daşkiran, İ., Savaş, T., Koyuncu, M., Koluman, N., Keskin, M., Esenbuğa, N., Konyalı, A., Cemal, İ., Gül, S., Elmaz, Ö., Koşum, N., Dellal, G., Bingöl, M., 2018. Goat production systems of Turkey: Nomadic to industrial. Small Ruminant Research, 163; 15-20

PASTINNOVA Project, Sustainable Pastoral Mobility Living Laboratory: Case Study Turkey

- D'Ottavio P., Francioni M., Trozzo L., Sedić E., Budimir K., Avanzolini P., Trombetta M. F., Porqueddu C., Santilocchi R. and Toderi, M., 2018. Trends and approaches in the analysis of ecosystem services provided by grazing systems: A review. In: *Grass and Forage Science*, 73(1), 15-25.
- Ertuğrul, M., Savaş, T., Dellal, G., Taşkın, T., Koyuncu, M., Cengiz, F., Dağ, B., Koncagül, S., Pehlivan, E., 2010. Türkiye küçükbaş hayvancılığının iyileştirilmesi. *Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, s. 667-685, 11-15, Ankara, 2010. [7]
- Folstad, A., 2008. Towards a living lab for development of online community services. *Electronic Journal of Organizational Virtualness*, 10, 47-58
- Franz, Y., 2015. Designing social living labs in urban research. *Info: the Journal of Policy, Regulation and Strategy for Telecommunications, Information and Media*, 17(4), 53.
- Aydın, M.K., Keskin, M., 2018. Muğla İlinde Küçükbaş Hayvan Yetiştiriciliğinin Yapısal Özellikleri. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 31 (3); 317-323
- Bebek, D.T., Keskin, M., 2018. Mersin İlinde Koyun Yetiştiriciliğinin Mevcut Durumu Bazı Verim ve Yapısal Özellikleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(2); 315-329
- Gül, S., Olfaz, N., Keskin, M., Behrem, S., 2022. The structural characteristics of sheep farming in Aksaray Province. *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 5(2): 1-11
- Karaca O., Odabaşoğlu F., Altın T., Söğüt B., Kaygısız A., 1990. Doğu Anadolu hayvancılığının yapısal özellikleri ve geliştirilmesi olanakları. *Hayvancılık'96 Ulusal Kongresi*, 168s, 18-20 Eylül, İzmir, 1990.
- Karaca O., Kaymakçı M., 1994. Güneydoğu Anadolu'da hayvancılığın geliştirilmesi için kimi öneriler. *Hayvansal Üretim Dergisi*, 35: 9, 1994.
- Karagöl, E., Keskin, M., 2018. Problems of Nomadic Goat Breeders and Their Effects on Forest. *Mugla Journal of Science and Technology*. 4 (1); 11-15
- Leminen, S., Niitamo, V. P., & Westerlund, M., 2017. A brief history of living labs: from scattered initiatives to global movement. *Proceedings of the Research Day Conference* (pp. 42).
- López-i-Gelats F., Fraser E. D., Morton J. F. and Rivera-Ferre M. G., 2016. What drives the vulnerability of pastoralists to global environmental change? A qualitative meta-analysis. In: *Global Environmental Change*, 39, 258-274.
- McLoughlin, S., Maccani, G., Prendergast, D., Donnellan, B., & Lero, N., 2018. Living labs: a bibliometric analysis. *Proceedings of the Hawaii International Conference on System Sciences (HICSS)*.
- Ragkos A., Koutsou S., Karatassiou M. and Parissi, Z. M., 2020. Scenarios of optimal organization of sheep and goat transhumance. In: *Regional Environmental Change*, 20(1), 1-10.
- Schuurman, D., De Marez, L., & Ballon, P., 2015. Living labs: a systematic literature review. *İstanbul: Open Living Lab Days 2015*.
- Westerlund, M., Leminen, S., & Rajahonka, M. (2018). A topic modelling analysis of living labs research. *Technology Innovation Management Review*, 8(7).
- Vagnoni E. and Franca A., 2018. Transition among different production systems in a Sardinian dairy sheep farm: Environmental implications. In: *Small Ruminant Research*, 159, 62-68.



Araştırma Makalesi

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Tülin EKER^{*1}, Rabia TURAN²

ÖZ

Bu çalışmada, beyaz, kırmızı ve siyah renkteki darılar çimlendirilerek un elde edilmiştir. Çimlenmemiş ve çimlenmiş unların kimyasal bileşimi, renk özellikleri, fenolik ve antioksidan potansiyeli ile mineral bileşimi belirlenmiştir. Darı unlarının nem içeriği çimlenme ile azalırken, protein içeriğinde hafif bir artış gözlenmiştir. Çimlenme işlemi, darı unlarının L^* değerlerinde genel bir artışa neden olmuştur. Çimlenme sürecinin beyaz, kırmızı ve siyah darı unlarının toplam fenolik bileşiminde sırasıyla 4.94, 4.96 ve 2.85 kat artışa neden olmuştur. Çimlenme ile mineraller arasında en çok artış kalsiyumda meydana gelmiştir. Çimlenmenin darı unlarında meydana getirdiği yapısal değişiklikler FT-IR spektroskopisi ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ülkemizde kuş yemi olarak bilinen darının, çimlendirilmesiyle insanlar için değerli bir fonksiyonel gıda kaynağına dönüşebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Darı, çimlendirme, toplam fenolik, antioksidan aktivite, mineral bileşimi, FT-IR

The Effect of Germination on the Chemical Composition, Phenolic and Antioxidant Potential of White, Red, and Black Millet (*Pennisetum glaucum*) Flour

ABSTRACT

In this study, white, red, and black millets were germinated to obtain flour. The chemical composition, color properties, phenolic and antioxidant potential, and mineral composition of ungerminated and germinated flours were determined. While the moisture content of millet flour decreased with germination, a slight increase in protein content was observed. Germination led to a general increase in the L^* values of millet flours. The germination process resulted in a 4.94-fold, 4.96-fold, and 2.85-fold increase in the total phenolic composition of white, red, and black millet flours. The most significant increase among minerals due to germination occurred in calcium. Structural changes induced by germination in millet flours were identified using FT-IR spectroscopy. These findings suggest that millet, known as birdseed in our country, can become a valuable functional food source for humans when germinated.

Keywords: Millet, germination, total phenolic, antioxidant capacity, mineral composition, FT-IR

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-9726-160X, 0009-0009-6479-8211

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 04.05.2024

Kabul Tarihi: 31.05.2024

¹Gıda Mühendisliği Bölümü, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Osmaniye

²Gıda Teknolojisi Bölümü, Kadirli Uygulama Bilimler Fakültesi, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Osmaniye

*E-posta: tulinsahin@osmaniye.edu.tr

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Giriş

Tahıllar, tarih boyunca insanların temel besin kaynaklarından biri olmuştur. Mısır, buğday ve pirinç gibi tahıllar bünyelerindeki lipitler, karbonhidratlar, proteinler, mineraller ve vitaminler ile insanların gıda tüketiminin yaklaşık %80'ini oluştururken küresel kalori ihtiyacının %50'sinden fazlasını karşılamaktadır (Pirzadah ve Malik, 2020).

Tarım sektörünün küreselleşmesi ve endüstrileşmesinin getirdiği tek çeşit tarım uygulamaları ve genetik çeşitliliğin azalması gibi olumsuz etkiler dünya genelinde hissedilmektedir. Tarım sektörü çoğunlukla buğday, pirinç ve mısır gibi birkaç tahıl türüne bağlı hale gelmiştir. Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte gıda kriziyle karşılaşmanın önemli bir zorluk olacağı vurgulanmaktadır (Jan ve ark. 2023). Bu bağlamda, yüksek besin profiline sahip olan ve 21. yüzyılın bitkileri olarak kabul edilen yalancı tahıl veya tahıl benzeri tohumlar olarak bilinen bitkilerin yetiştirilmesi ve kullanımının gözden geçirilmesi önemlidir. Tahıl benzeri tohumlar içerisinde adı geçen darı türlerinin zengin besin profilinden dolayı önemli bir potansiyele sahip olduğu belirtilmektedir (Yousaf ve ark., 2021). Darı türleri (millets) zengin fitokimyasal bileşimi ve sağlığa faydaları nedeniyle günümüzde gıda bilimcileri ve beslenme bilimcilerinin ilgisini çekmektedir. Dünyada üretimi yapılan çok sayıda darı cins ve türü olmasına rağmen, en fazla üretimi yapılan darılar; inci darı (Pearl millet) (*Pennisetum glaucum*), rahi darısı (Finger millet) (*Eleusine coracana*), kodo darı (*Paspalum setaceum*), kum darı (Proso Millet) (*Panicum miliaceum*), cin darı (Foxtail Millet) (*Setaria italica*), küçük darı (Little Millet) (*Panicum sumatrense*) ve darıcandır (*Echinochloa utilis*) (Boz, 2014; Dumanoglu ve ark., 2022). Darı türleri kuraklık, olumsuz hava koşulları ve gübre ve böcek ilacı gibi kimyasal girdilere ihtiyaç duymadan yetişebilen, ülkemizde daha çok kuş yemi olarak bilinen küçük taneli gıdalardır. Glutensiz tahıllar içinde yer alan olan darı türleri düşük glisemik Baklagil ve tahılların çimlendirilerek tüketilmesi son zamanların beslenme eğilimlerinden biri olmuştur. Aralarında çemen tohumu, acı bakla, nohut, mercimek ve fasulyenin olduğu

indekse (GI) sahiptir ve diyet lifi, kalsiyum, demir ve fosfor gibi minerallerin iyi bir kaynağı olması bakımından günümüzün öne çıkan gıda grupları arasındadır (Abioye ve ark., 2022). Gıda ve Tarım Örgütü 2023 yılı “Uluslararası Darı Yılı” ilan ederek darının beslenme ve sağlık yararlarına yönelik farkındalık yaratmayı ve çeşitli darı türlerinin tarımsal üretimini, kullanımını ve pazarlama potansiyelini arttırmayı amaçlamaktadır (FAO, 2023). Besin bileşenleri bakımından diğer bazı tahıl çeşitleri ile kıyaslandığında *E. coracana* darıda kalsiyum içeriğinin 350 mg/100g olduğu, *E. utilis* darının 18.6 mg/100g seviyesiyle buğdayın yaklaşık beş katı demir içerdiği belirlenmiştir (Saleh ve ark., 2013; Shahidi ve Chandrasekara, 2013). Darıların genel olarak lif bakımından mısır ve buğdaydan daha zengin olduğu, ayrıca bazı darı çeşitlerinin tiyamin ve riboflavin açısından öne çıktığı anlaşılmaktadır (Boz, 2014). Diğer taraftan fenolik içerik bakımından cin darı, kum darı, kodo darı, küçük darı, darıcan, rahi darısı ve inci darılarının aralarında olduğu Hindistan menşeli çeşitlerde ferulik asit ve onu takiben kafeik asit baskın fenolik asitler olarak belirlenmiştir (Goudar ve ark., 2023). Başka bir çalışmada ise rahi darısının çözünür fenolik bileşik içeriğinin 81.67-410.31 mg/100 g arasında bağlı fenolik bileşik miktarının ise 58.16-252.32 mg/100 g arasında değiştiğini bildirmiştir (Jinle ve ark., 2019). Polifenol ve diyet lifi içeriği ile diyabet riskini en aza indirme ve kolesterol düşürücü etkisi gibi birçok sağlık faydası bildirilen darı türlerinin fonksiyonel gıda bileşeni olarak giderek ünlendiği görülmektedir (Abioye ve ark., 2022). Darı türleri hakkında son zamanlarda yapılan bir derlemede darı çeşitlerinin gıda olarak kullanımı detaylıca ele alınmış insanların darı türlerinin sağlık faydaları hakkında bilinçlenmeleri ve bu tahılların tüketilmesinin önemine dikkat çekilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Hassan ve ark., 2021). Örneğin inci darısının glutensiz olması ve pirince göre daha yüksek lif içermesi nedeniyle çölyak hastaları için iyi bir gıda kaynağı olabileceği bildirilmiştir (Saleh ve ark., 2013). baklagillerin filizlendirme ile kotiledon, kökçük ve tohum kabuklarında bulunan toplam flavonoid bileşiklerinin miktarı ve antioksidan aktivitesi artmıştır (Saleh ve ark., 2019).

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Filizlenme sırasında fenol bileşikleri gıda matriksinden serbest kalmakta ve vücut biyoaktif bileşiklerden daha fazla yararlanmaktadır (Saleh ve ark., 2019). Benzer şekilde nohut, kırmızı mercimek, maş fasulyesi ve barbunyanın antioksidan aktivitelerinin filizlenme ile %14 ila %35 arasında arttığı bildirilmiştir (Mamilla ve Mishra, 2017). Başka bir çalışmada buğday, arpa, yulaf, kinoa, amarant, yeşil mercimek, nohut ve maş fasulyesi taneleri farklı sürelerde (1, 3 ve 5 gün) çimlendirilmiş ve çimlendirme ile tanelerin; kül, ham protein ve yağ miktarları artmıştır. Doğal tanelere kıyasla çimlendirilmiş tanelerin, daha yüksek fenolik madde içerdiği ve çimlendirme süresinin artmasına bağlı olarak fitik asit miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Kılınçer ve Demir, 2019). Başka bir çalışmada 6 gün boyunca çimlenen kum darıdan elde edilen ekstraktın antioksidan aktivitesi çimlenmeyenlere kıyasla önemli düzeyde yükselmiştir (Jinle Xiang ve ark. 2023). Yine cin darı, kum darı ve karabuğday tohumlarının çimlenmesi ile saponin, tanen ve fitik asit gibi anti-besinsel maddeler azalırken fenolik bileşik miktarının arttığı bildirilmiştir (Kumari ve ark., 2023).

Ülkemizde darı türleri daha çok kuş yemi olarak bilinmekte ve satılmaktadır. Kafes kuşları için kullanılan darı karışımlarında akdarı, kırmızı darı ve inci darı en çok kullanılan darı türleridir (Anonim, 2019). Literatür değerlendirildiğinde ülkemizde darı türleri ile ilgili yapılan çalışmalar daha çok morfolojik özellikler (Dumanoglu ve ark. 2022), üretim verimi ve yem kalitesi (Geren ve ark., 2019; Öktem ve ark., 2021) ile biyoetanol üretiminde kullanılmasının uygunluğu (Soylu, 2012) ile ilgilidir. Boz (2014) ise özellikle yabancı kaynaklardan elde ettiği bilgileri derleyerek darının kimyasal bileşimi ve insan sağlığı açısından potansiyel faydalarını konu alan bir çalışma yapmıştır. Bu çalışma ülkemizde son derece sınırlı düzeyde üretimi yapılan ve tüketilen darıyı gıda yönü ile ele alarak, günümüzün önemli beslenme eğilimlerinden biri olan çimlendirme işlemi ile ilgi çekici bir gıda haline getirmeyi amaçlamıştır. Bu kapsamda kuş yemi olarak satılan darı karışımı taneleri renge göre beyaz, kırmızı ve siyah olarak sınıflandırılmış ve

ardından her renk ayrı ayrı çimlendirilmiştir. Çimlenmemiş ve çimlenmiş tanelerden elde edilen unların genel kimyasal bileşimi, biyoaktif potansiyeli (toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan aktivitesi), mineral bileşimi ile FT-IR spektroskopi analizleri yapılmıştır. Bu çalışma, ülkemizde kuş yemi olarak kullanılan darının insan tüketimi için değerli bir besin kaynağı olarak değerlendirilmesine yönelik ilk çalışmadır.

Materyal-Yöntem Darı Örnekleri

Çalışmada kuş yemi olarak beyaz, kırmızı ve siyah renkteki çeşitlerin karışımı halinde satılan inci darı (Pearl millet) (*Pennisetum glaucum*) kullanılmıştır. Darılar Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde yer alan yerel bir satıcıdan (Beyza Yem) temin edilmiştir. Darılar renklerine göre beyaz, kırmızı ve siyah darı olarak ayrılmış kilitli poşetler içinde +4 °C'de analizler boyunca saklanmıştır.

Çimlendirme İşlemi

Darı örneklerinin çimlendirilmesi Kılınçer ve Demir (2019)'e göre yapılmıştır. İlk olarak darı örnekleri çimlenmemiş ve çimlendirilecek taneler olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Çimlenecek taneler saf su ile yıkanıp süzülerek temizlenmiştir. Ardından, darı taneleri üzerine 3 katı olacak şekilde saf su ilave edilerek oda sıcaklığında (24±1 °C), karanlık bir ortamda 24 saat boyunca ıslatılmaya bırakılmıştır. Islatma süresi sonunda taneler süzülerek, tülbent ve pamuktan oluşan iki katman arasına ince bir tabaka halinde yerleştirilmiştir. Taneler 12 saatte bir saf sudan geçirilmiştir. 3 günün sonunda çimlenen taneler kuru bir yere alınarak çimlenme durdurulmuştur. Çimlendirilmiş taneler kurutma kâğıtlarının üzerine serilerek oda sıcaklığında birkaç gün kurumaya bırakılmıştır. Kurutmanın ardında çimlenmemiş ve çimlenmiş örnekler bir kahve öğütücüsünde (Fakir, Roxy, Çin) 1 dakika boyunca öğütülerek tam darı unu elde edilmiş ve hava geçirmeyen kilitli polietilen poşetler içerisinde soğutucuda (-4 °C) analizler bitene dek muhafaza edilmiştir.

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Unununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi



Şekil 1. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı taneleri

Renk Analizi

Darı taneleri, çimlenmemiş ve çimlenmiş darılardan elde edilen unlarda renk analizi L^* , a^* , b^* ölçüm sistemine göre el tipi renk ölçüm cihazı (Minolta, C400, Japonya) kullanılarak yapılmıştır. Örnekler cam petri kabına zemini göstermeyecek şekilde yayılmış ve renk ölçer yardımıyla farklı noktalardan üç ölçüm alınmıştır. Çimlenme ile örneklerde meydana gelen toplam renk değişimleri $\Delta E = ((\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2)^{1/2}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Goudar ve ark., 2023).

Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Düşük toksisitesi, kolayca temin edilebilmesi ve doğal antioksidanların ekstraksiyonunda polar çözücü olarak yaygın olarak kullanılması nedeniyle bu çalışmada ekstraksiyon çözücü olarak sulu etanol çözeltisi kullanılmıştır (Nakilcioğlu-Taş ve Ötleş, 2021). 1 g örnek tartılmış ve hacmi %50'lik etanol ile 40 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından örnekler homojenizatörde (WiseTis, HG-15D, Kore) 200 rpm'de 1 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Örnekler ultrasonik su banyosuna (JP Selecta, 3000865, İspanya) yerleştirilmiş ve 25 °C'de, 20 dk boyunca ekstraksiyona bırakılmıştır. Ardından örnekler santrifüjde 3500 rpm'de 15

Genel Kimyasal Bileşim

Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının nem, kül, yağ ve protein analizleri AOAC (2016)'ya göre yapılmıştır. Nem miktarı etüvde kurutma yöntemi ile, toplam protein içerikleri Kjeldahl metodu ile belirlenmiştir. Kül içeriği, örneklerin 550 °C'lik fırında 6 saat yakılması ile belirlenmiştir. Örneklerin içerdiği toplam yağ miktarı ise Sokslet metoduyla çözücü olarak hekzan kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin genel kimyasal bileşimine ait bulgular yüzde (%) cinsinden verilmiştir.

15 dakika boyunca santrifüj (Hettich, 220R, ABD) edilmiş ve üst faz ayrılarak analizlerde kullanılmıştır. Örneklerin toplam karbonhidrat içeriği, nem, kül, protein ve yağ içeriklerinin 100'den çıkarılması yoluyla hesaplanmıştır. Sonuçlar yüzde olarak ifade edilmiştir.

Toplam Fenolik Bileşik Miktarı

Darı ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarı Singleton ve Rossi (1965)'ye göre yapılmıştır. Bir deney tüpüne 0.2 ml ekstrakt ve 10 kat seyreltilmiş 1.5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve tüpler vortekste karıştırılmıştır. 5 dakika beklemenin ardından örneklerin üzerine 1.5 ml sodyum karbonat (%6, ağırlık/hacim, a/h) eklenmiş ve tüpler karıştırılmıştır. Kör çözelti ise ekstrakt yerine tüpe aynı miktarda saf su ilave edilerek, diğer

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

işlemler aynı olacak şekilde hazırlanmıştır. Oda koşullarında, karanlıkta 1.5 saat bekletilen örnekler 725 nm’de spektrofotometrede (Shimadzu, UV1800, Japonya) köre karşı okunmuştur. Sonuçlar oluşturulan standart eğri kullanılarak yaş ağırlık (YA) üzerinden gallik asit cinsinden (mg GAE/100 g YA) ifade edilmiştir.

Toplam Flavonoid Miktarı

Darı ekstraktlarının toplam flavonoid miktarları Chukwumah ve ark. (2009), tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. 2 ml ekstrakt üzerine 1.25 ml saf su ve 150 µL NaNO₂ (%5, *a/h*) eklenmiş ve örnekler iyice karıştırılmıştır. 5 dk beklemenin ardından 150 µL AlCl₃ (%10, *a/h*) eklenmiştir. Karıştırılan örnekler üzerine 1 ml 1 M NaOH ve 1.2 ml saf su ilave edilerek 10 dk beklemeye bırakılmıştır. Oluşan sarı-turuncu rengin absorbansı 510 nm’de ölçülmüştür. Sonuçlar oluşturulan standart eğri kullanılarak yaş ağırlık üzerinden kuarsetin cinsinden (mg KE/100 g YA) ifade edilmiştir.

DPPH ile Antioksidan Aktivite Analizi

Darı ekstraktlarının antioksidan aktivitesi Tanriseven ve ark. (2020)’larına göre yapılmıştır. 0.1 ml ekstrakt üzerine %80’lik metanol içinde hazırlanmış ve absorbansı 0.7’ye ayarlanmış DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, 6×10^{-5} M) radikalinden 3.9 ml eklenmiştir. Karışım vorteks ile karıştırıldıktan sonra 30 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbansı spektrofotometrede (Shimadzu, UV1800, Japonya) 515 nm’de belirlenmiştir. Sonuçlar troloks standardı ile hazırlanmış kalibrasyon eğrisine göre yaş ağırlık üzerinden verilmiştir (mg TE/100 g YA).

Mineral Analizi

Darı unu örnekleri 2N HCl ile seyreltilerek minerallerin serbest kalması sağlanmıştır. Daha sonra örneklerdeki K, Ca, Mg, P, Mn, Fe ve Zn elementleri Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresinde (Agilent, 240FS AA, Avustralya) belirlenmiştir. Darı unlarının mineral analizi sonuçları yaş ağırlık üzerinden

mg/kg düzeyinde verilmiştir (Kacar ve İnal, 2008).

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Analizleri

FT-IR analizi için darı unları cihaz üzerindeki kristal yüzey üzerine konulmuş ve FT-IR absorpsiyon spektralleri FT-IR spektrometresi (Perkin-Elmer Spectrum TwoTM, Waltham, MA, ABD) kullanılarak 4 000 ve 650 cm⁻¹ dalga boyu aralığında, 0.5 cm⁻¹ spektral rezolusyonda ve 4 tarama sayısı sonucunda elde edilmiştir. Her örnekten önce arka plan spektrumu alınarak örneklerin spektrumlarından çıkarılmış ve analize devam edilmiştir. IR spektrumu, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin parmak izini göstererek organik ve inorganik bileşiklerin karakterize edilmesinde kullanılmıştır (Büyüksirt ve Kuleşan, 2014).

İstatistiksel Analizler

Çalışma kapsamında incelenen darı unu örneklerinin analiz sonuçları SPSS 18 paket programı (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) kullanılarak %95 güven seviyesinde ($p \leq 0.05$) varyans analizine tabi tutulmuştur ve Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, önemli bulunan farklılıklar incelenmiştir. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unu örneklerinin ortalamaları arasındaki farklar ise bağımsız örneklem T-testi kullanılarak (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$ ve (***) $p \leq 0.001$ önem düzeylerinde incelenmiştir. Toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid ve antioksidan aktivite arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon katsayıları ($p \leq 0.05$) hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Genel Kimyasal Bileşim

Çimlenmiş ve çimlenmemiş darılardan elde edilen unlara ait genel kimyasal bileşim Çizelge 1’de verilmiştir. Örneklerin kül ve yağ içerikleri çimlendirme işleminden etkilenmemiş ve tüm örnekler kül ve yağ içerikleri bakımından istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Literatürde, çimlenme sürecinin yağ içeriği üzerindeki etkisi konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin Sharma ve ark. (2016),

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

çimlenme ile darı unu örneklerinin yağ içeriğinin %5.31'den %3.4'e düştüğünü rapor ederken Prasad ve Sahu (2023) 48 saatlik çimlenmenin darı ve beyaz kinoa ununun protein ve yağ içeriğindeki değişimine etkisini istatistiksel olarak önemsiz bulmuştur. Öte yandan Kayısoğlu ve ark. (2024), beyaz ve kırmızı sorgumda çimlenme ile yağ içeriklerinde artış bildirmiştir. Bu çalışmada istatistiksel olarak önemli olmasa da benzer şekilde artan yağ içeriği çeşitli faktörlere bağlanabilir. İlk olarak, tohum içinde depolanan yağların, proteinlerin ve karbonhidratların harekete geçirilmesi, büyüyen fide için enerji sağlar. Tohum metabolik süreçlerden geçerken, depolanan proteinlerin ve karbonhidratların parçalanması, yağların sentezi ve birikimine yol açabilir. Ayrıca, çimlenme sırasında lipid biyosentez yollarının aktivasyonu, hücre bölünmesi ve genişlemesi için gerekli yeni lipidlerin üretimine katkıda bulunur. Ayrıca çimlenme sürecinde, enzimatik aktiviteler artar ve bu enzimler, lipidlerin daha basit ve ekstrakte edilebilir formlara ayrışmasına neden olabilir (Gujral ve ark., 2011, Kayısoğlu ve ark., 2024).

Darı unlarının nem içerikleri çimlendirme işlemi ile genel olarak düşmüştür. Örneklerin nem içeriklerindeki düşüş kırmızı darıda en fazla olmuştur. Bu çalışmada elde edilen nem bulgularına benzer şekilde, Ochame ve Chinma, (2008) çimlenme ile artan kuru madde miktarının çimlenme sırasında gerçekleşen enzimatik aktivitelerin sonucu olduğunu bildirmiştir.

Darı unlarının protein içerikleri çimlendirme ile genel olarak artsa da bu artış her bir darı unu için istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Çimlenmiş ve çimlenmemiş beyaz darıdan elde edilen unlar protein içeriği bakımından kırmızı

ve siyah darı unlarına göre daha düşük bir değer göstermiştir. Bir çalışmada, çimlenmenin inci darısının protein içeriğinde %50'ye kadar önemli bir artışa neden olduğu bildirilirken (Akinola ve ark., 2017), Perales-Sánchez ve ark. (2014), ragi darısında çimlenmenin protein içeriğini hafif ama istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığını bildirmiştir. Benzer sonuçlar Obadina ve ark. (2017), tarafından da rapor edilmiş, inci darısında 24 saat çimlenme ile protein içeriği %7.52'den %7.87'ye hafif şekilde yükselmiştir. Çalışmada protein içeriğindeki genel artış, çimlenme süreci sırasında yeni amino asitlerin biyolojik sentezine bağlanabilir (Sharma ve ark., 2016).

Çalışmada örneklerin toplam karbonhidrat içeriği %71.32-74.70 aralığında değişmiş ve tüm örneklerin toplam karbonhidrat içerikleri istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Çalışmada elde edilen toplam karbonhidrat değerleri darı unu için önceki çalışmada bildirilen değerlerin (%72-79.5) aralığında kalmıştır (Bhat ve ark., 2003). İnci darıda toplam karbonhidrat bileşimini nişasta baskın olmak üzere diyet lifi ve çözünebilir şekerler oluşturmaktadır (Hassan ve ark., 2021). Benzer şekilde, Parameswaran ve Sadasivam (1994) 2 ve 3 gün çimlenme süresinde darılarda karbonhidrat içeriğinde anlamlı bir fark olmadığını bildirmiştir. Çimlenme sırasında değişim göstermeyen karbonhidrat içeriği nem, yağ, protein, kül ve lif gibi diğer besin bileşenlerinin artış ve azalışlarına bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir (Derbew ve Moges, 2017). Farklı renklerdeki darı örneklerinden elde edilen unların çimlenme ile besin bileşimi bakımından benzer değişimleri gösterdiği bulunmuş ve bu değişimler literatür ile uyum içinde olmuştur.

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Çizelge 1. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının genel kimyasal bileşimi

	Örnekler	Kül (%)	Nem (%)	Yağ (%)	Protein (%)	Toplam Karbonhidrat (%)
Çimlenmemiş	Beyaz	2.68 ^a ±0.30	8.36 ^{ab} ±0.23	5.60 ^a ±0.83	9.2 ^b ±0.01	74.17 ^a ±0.91
	Kırmızı	2.63 ^a ±0.00	8.68 ^{ab} ±0.01	5.81 ^a ±0.21	11.58 ^a ±0.06	71.32 ^a ±0.28
	Siyah	2.32 ^a ±0.05	8.82 ^a ±0.63	3.39 ^a ±0.70	11.67 ^a ±0.07	73.82 ^a ±0.08
Ort.		2.54±0.22	8.61±0.36	4.92±1.30	10.82±1.26	73.10±1.46
Çimlenmiş	Beyaz	2.60 ^a ±0.10	7.55 ^{ab} ±0.35	6.54 ^a ±0.21	9.97 ^b ±0.18	73.35 ^a ±0.13
	Kırmızı	2.40 ^a ±0.00	5.98 ^c ±0.05	4.35 ^a ±1.77	12.58 ^a ±0.21	74.70 ^a ±0.31
	Siyah	2.51 ^a ±0.06	7.72 ^{ab} ±0.01	5.62 ^a ±0.35	11.88 ^a ±0.57	72.28 ^a ±0.17
Ort.		2.50±0.10	7.08±0.87	5.50±1.28	11.48±1.24	73.44±1.39
F(çimlenme)		ÖD	**	ÖD	ÖD	ÖD

^{a-b} Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($p \leq 0.05$).

F(çimlenme): Çimlenmenin ortalamalar üzerindeki etkisinin önem düzeyi: (ÖD) önemli değil; (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; (***) $p \leq 0.001$

Renk Analizi

Doğal darı tanelerinin, çimlenmemiş ve çimlenmiş tanelerden elde edilen unların renk özellikleri Çizelge 2’de verilmiş ve çalışmada elde edilen unlar Şekil 2’de gösterilmiştir. İşlem görmemiş doğal darı tanelerinin renk özelliklerine bakıldığında, beklenildiği gibi beyaz darı tanelerinin L^* değerinin en yüksek olduğu ve bunu sırasıyla kırmızı ve siyah tanelerin takip ettiği görülmektedir. L^* değeri örneklerin aydınlık/parlaklık derecesini gösterirken ve 0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında değerler almaktadır. Pozitif a^* ve b^* değerleri ise sırasıyla kırmızılık ve sarılığın göstergesidir (Kayisoglu ve ark., 2024). Kırmızı darı taneleri a^* ve b^* değerleri bakımından tüm örneklerden istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek değerlere sahip olmuştur. Bu da kırmızı tanelerin diğerlerine kıyasla daha kırmızısı ve sarımsı özellikte olduğunu gösterir. Doğal darı tanelerin un haline getirilmesi ile elde edilen çimlenmemiş un örneklerinin L^* değerlerinde artış meydana gelmiş ve L^* değeri bakımından yine beyaz taneler en yüksek değere sahip olurken onu sırasıyla kırmızı ve siyah çimlenmemiş darı unları takip etmiştir. Öğütme işlemi darının tane yapısının kırılarak daha homojen bir şekilde dağılmasına sağlamış ve ışığın daha iyi yansıtılmasına neden olmuştur.

Çimlenme işlemi, darı tanelerinin L^* değerlerinde genel bir artışa neden olmuştur. Çimlenmenin ortalama L^* değerleri üzerine etkisi istatistiksel açıdan önemli bulunmasa da bu artış kırmızı ve siyah renkli çimlenmiş tanelerden elde edilen unlarda istatistiksel açıdan önemli olmuştur. Benzer şekilde Nefale ve Mashau (2018) darı unlarının çimlenme ile L^* değerlerinin arttığını ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığını bildirmiştir. Çimlenme işlemi ile kırmızı darının a^* değerinde istatistiksel açıdan önemli bir düşüşe neden olmuş diğer örneklerin a^* değerleri arasında çimlenme ile önemli bir değişiklik olmamıştır. Tüm örneklerin b^* değerleri çimlenme ile önemli düzeyde düşmüş ve bu düşüş çimlenmemiş ve çimlenmiş tanelerin ortalama değerleri arasında da anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Cin darı, rağı darısı ve inci darının kullanıldığı bir çalışmada çimlenme sonrası elde edilen darı unlarının L^* değerinde artış gözlenmiştir (RP ve ark., 2023). Çimlenmenin örneklerin renk değerlerinde meydana getirdiği toplam değişim ΔE değerinin hesaplanması ile belirlenmiştir. ΔE değeri beyaz, kırmızı ve siyah darıda sırasıyla 7.65, 8.11 ve 8.27 olarak hesaplanmıştır. Örneklerin toplam renk değişimleri arasındaki fark istatistiksel olarak benzer bulunmuştur.

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi



Şekil 2. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarına ait resimler

Çizelge 2. Doğal darı tanelerinin, çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının renk özellikleri

		<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
Doğal darı tanesi	Beyaz	67.91 ^c ±0.77	4.5 ^c ±0.24	28.93 ^b ±0.78
	Kırmızı	39.03 ^e ±1.98	18.04 ^a ±1.24	36.3 ^a ±1.64
	Siyah	18.16 ^f ±1.58	9.27 ^b ±0.78	10.01 ^f ±1.16
Çimlenmemiş (un)	Beyaz	78.41 ^a ±1.32	0.87 ^e ±0.05	25.68 ^c ±0.52
	Kırmızı	68.73 ^c ±1.32	3.81 ^{cd} ±0.94	25.16 ^c ±0.76
	Siyah	60.76 ^d ±1.46	1.55 ^e ±0.11	14.34 ^e ±0.57
Ort.		69.30±7.74	2.07±1.41	21.73±5.57
Çimlenmiş (un)	Beyaz	78.62 ^a ±1.62	1.19 ^e ±0.16	18.41 ^d ±0.24
	Kırmızı	73.74 ^b ±1.10	2.58 ^{de} ±0.70	19.10 ^d ±0.63
	Siyah	68.85 ^c ±2.62	1.06 ^e ±0.33	13.11 ^e ±0.36
Ort.		73.74±4.54	1.61±0.83	16.87±2.86
F(çimlenme)		ÖD	ÖD	*

^{a-e} Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($p \leq 0.05$).

F(çimlenme): Çimlenmenin ortalamalar üzerindeki etkisinin önem düzeyi: (ÖD) önemli değil; (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; (***) $p \leq 0.001$

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Çimlenmenin farklı tahıl tohumlarındaki etkisinin incelendiği başka bir çalışmada ise, 48 saatlik çimlenme ile cin darı (Foxtail millet) unlarının L^* ve a^* değerlerinde düşüş, b^* değerinde ise yükselme meydana gelmiştir (Li ve ark., 2020). Bu çalışmada elde edilen L^* ve a^* değerlerindeki değişim Li ve ark. (2020)'nın bildirdiği bulgulardan farklılık göstermektedir. Farklı sonuçlar elde etmemizin nedeni, kullanılan çeşitlerin farklı olmasından kaynaklanabilir. Çimlenme işlemi sırasında, unların renk değerlerindeki değişimler, çimlenme sürecinde nişasta ve protein yapılarında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanabilir. Bu değişiklikler, çimlenme sırasında aktif olan enzimlerin etkisiyle gerçekleşir. Ayrıca, çimlenme sürecinde uygulanan ıslatma, darıların renk bileşiklerinin suda çözünmesine neden olabilir, bu da renk değerlerinde değişikliklere yol açabilir (Kayisoglu ve ark., 2024).

Toplam Fenolik Bileşim, Toplam Flavonoid ve Antioksidan Aktivite

Darı unu örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid içerikleri ile antioksidan aktiviteleri Çizelge 3'te verilmiştir. Çimlenmemiş darı unlarının toplam fenolik içerikleri 68.08-124.98 mg GAE/100 g YA aralığında iken çimlenmiş darı unları 336.71-356.43 mg GAE/100 g YA aralığında değişmiştir. Çimlenme toplam fenolik bileşimde dramatik bir artışa neden olmuş ve bu artış beyaz, kırmızı ve siyah darı unlarında sırasıyla 4.94, 4.96 ve 2.85 kat olmuştur. Çimlenmiş darı unlarının toplam fenolik bileşik bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak önemsiz olurken, çimlenmemiş siyah darı unlarının (124.98 GAE/100 g YA) toplam fenolik içeriği beyaz (68.08 mg GAE/100 g YA) ve kırmızı darılara (71.64 mg GAE/100 g YA) göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Çimlenme süreci tüm örneklerde flavonoid içeriğini bir miktar artırmıştır ve çimlenmiş siyah darının flavonoid içeriği en yüksek değere (38.8 mg QE/100 g YA) ulaşmıştır. Beyaz, kırmızı ve siyah darıdaki flavonoid artışı sırasıyla 1.02, 1.13 ve 1.08 olurken, darı ununun antioksidan aktivitesinde artış 1.10, 1.41 ve 1.04 kat olmuştur. Bu artış beyaz ve kırmızı darıda istatistiksel olarak

önemli bulunmuştur. Toplam flavonoid ve antioksidan aktivitedeki artış toplam fenolik bileşiklerdeki artışa göre düşük olmuştur. James ve ark., (2022) 3 gün boyunca süren çimlenmede darının toplam fenolik bileşik miktarının süreye bağlı olarak azaldığını bildirmiştir. Aynı çalışmada ise toplam flavonoid ve antioksidan aktivitenin 3 günlük bir çimlenme sonunda sırasıyla 1.13 ve 1.16 kat arttığı rapor edilmiştir. James ve ark., (2022)'nin çalışması toplam fenolik bileşik bakımından bizim çalışmamızdan farklılık gösterse de toplam flavonoid ve antioksidan aktivitedeki değişimler bakımından benzer olmuştur. Sokrab ve ark. (2012)'da çalışmasında mısırdaki fenolik bileşiklerin çimlenme ile azalışına dikkat çekmiş bu azalışın çimlenme boyunca yapılan ıslatma uygulamasına bağlı olarak hidrofilik bileşenlerin konsantrasyonunda, tanen ve antosiyanin bileşiklerinin miktarında meydana gelen azalmaya bağlı olduğunu rapor etmiştir. Literatür özetlendiğinde çimlenme sırasında fenolik bileşiklerde gözlenen değişikliklerin bitkinin doğal gelişim sürecinin bir parçası olduğunu göstermektedir. Flavonoidler, fenolik bileşiklerin bir alt sınıfıdır. Çimlenme sürecinde bitkilerdeki enzimatik aktivite, fenolik bileşiklerin genel üretimini artırabilir, ancak flavonoidlerin spesifik biyosentezi farklı düzenleyici mekanizmalara bağlı olabilir. Bu nedenle, bu çalışmada tüm fenolik bileşiklerin artışı flavonoidler üzerinde aynı etkiyi yaratmamış olabilir. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unları toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid içeriği ve antioksidan aktivite değerleri açısından genellikle benzer bir eğilim göstermiştir. Analiz edilen parametreler bakımından, siyah darı genellikle en yüksek değerlere sahip olurken, onu kırmızı darı takip etmiş ve en düşük değerlerin beyaz darıda olduğu gözlenmiştir. Bu durum, darı renginin fenolik bileşenler, flavonoidler ve toplam antioksidan aktivite üzerine etkisinin olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Mikulajová ve ark. (2017), cin darısına ait çeşitli renkteki darı taneleri üzerinde yaptıkları çalışmada koyu renkli tanelerin daha yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriğine sahip olduğunu ve bu tanelerin daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada,

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

çimlenme sonrasında farklı renkteki darılar arasındaki toplam fenolik içerik farklılıkları ortadan kalkmıştır. Bu durum tahılların tohum zarı rengine katkıda bulunan ve fenolik bileşiklerin bir türü olan tanenler ile açıklanabilir (Kayısoglu ve ark., 2024). Swela ve ark. (2007), tohum zarının siyah olduğu darı çeşitlerinde tanen içeriğinin en yüksek olduğunu bildirmiştir. Anti-besinsel bileşikler arasında yer alan tanenlerin çimlenme süreci ile parçalanıp azaldığı iyi bilinmektedir (Yenasew ve Urga, 2022). Başlangıçta farklı renkteki tohumlar, tanen ve diğer fenolik bileşiklerin miktarı nedeniyle farklı toplam fenolik içeriklere sahip olmuştur. Ancak çimlenme süreci, bu fenolik bileşiklerin parçalanmasına, mobilize edilmesine ve yeniden dağılmasına neden olur. Bu durum çimlenme sonrasında, farklı renkteki tohumların fenolik içeriklerinin benzer seviyelere gelmesini ve siyah darıda toplam fenolik artışının diğer darılara kıyasla daha düşük olmasını açıklayabilir.

Çimlenmenin darı unlarının veya tohumlarının fenolik içeriklerinde meydana getirdiği değişimler literatürde bildirilmiştir. Örneğin, bir çalışmada, proso darısının 5 günlük filizlenmesi sırasında fenolik içeriğinin 3.5 kat arttığı bildirilmiştir (Bazhenova ve ark., 2019). Benzer şekilde Pradeep ve Sreerama (2015) filizlenmiş darılardan elde edilen unların en yüksek fenolik, flavonoid içeriğine ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Sharma ve ark. (2016), çimlenmenin darıda bulunan fenolik bileşikler üzerine etkisini serbest, bağlı ve toplam fenolik içeriği bakımından incelemiş ve bu artışların sırasıyla 11.46'dan 32.22 mg GAE/100 g, 17.55'ten 25.46 mg GAE/100 g ve 29.01'den 77.68 mg GAE/100 g olduğunu bildirmiştir. Çimlenme ile fenolik içeriğinde

meydana gelen bu artış, hücre duvarını parçalayan enzimlerin aktivasyonunun bir sonucu olarak darı tanelerinin hücre duvarına bağlı fenollerin salınması sonucu gerçekleşmiş olabileceği rapor edilmiştir (Sharma ve ark., 2016).

Çalışmada, toplam flavonoid içeriği ile toplam fenolik bileşik arasında ($r=0.373$, $p\leq 0.05$), toplam flavonoid ile antioksidan aktivite arasında ($r=0.417$, $p\leq 0.05$) ve toplam fenolik bileşik ile antioksidan aktivite arasında ($r=0.386$, $p\leq 0.05$) pozitif ve anlamlı ilişkiler bulunmuştur. Bu sonuçlar, fenolik ve flavonoid bileşiklerinin antioksidan aktivite ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Önceki çalışmalar, çimlenmenin sorgumda (Li ve ark., 2022), buğday, arpa ve darıda (Kaur ve Gill, 2021) amaranth, kinoa ve karabuğdayda (Thakur ve ark., 2021) DPPH ile belirlenen antioksidan aktivitede önemli ölçüde artışa neden olduğu rapor edilmiştir. Çeşitli çalışmalarda ise tahıllarda çimlenme ile toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan aktivite arasında meydana gelen ilişkiler incelenmiştir. Örneğin Sharma ve Gujral (2011), 24 saat boyunca çimlenen arpa ununda, toplam fenolik içerik ile antioksidan aktivite arasında pozitif ve anlamlı ($r=0.494$) bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Pushparaj ve Urooj (2014) ise inci darıda, flavonoid içeriği ile DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi arasında ($r=0.712$, $p\leq 0.01$), indirgeme gücü ile flavonoid içeriği arasında ($r=0.456$, $p\leq 0.05$) pozitif ilişkiler tespit etmiştir. Tahıl ve tahıl benzeri tohumların antioksidan potansiyeli genellikle fenolik bileşiklerden ileri gelir. Çimlenme ile artan toplam fenolik bileşik miktarı toplam antioksidan aktivitenin artışına neden olabilir (Kayısoglu ve ark., 2024).

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Çizelge 3. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının toplam fenolik bileşim, toplam flavonoid ve antioksidan aktivite değerleri

	Örnekler	Toplam Fenolik Bileşik (mg GAE ^x /100 g YA darı unu)	Toplam Flavonoid (mg KE ^y /100 g YA darı unu)	Antioksidan Aktivite (mg TE ^z /100 g YA darı unu)
Çimlenmemiş	Beyaz	68.08 ^c ±6.4	27.39 ^c ±1.31	360.95 ^{bc} ±18.22
	Kırmızı	71.64 ^c ±7.35	33.28 ^b ±1.2	277.14 ^c ±65.13
	Siyah	124.98 ^b ±7.81	35.9 ^{ab} ±3.07	504.76 ^a ±33.84
	Ort.	88.23±27.62	32.19±5.20	380.95±105.06
Çimlenmiş	Beyaz	336.71 ^a ±11.95	27.98 ^c ±1.14	396.19 ^b ±83.72
	Kırmızı	355.49 ^a ±24.51	37.56 ^b ±2.19	389.52 ^b ±22.69
	Siyah	356.43 ^a ±8.74	38.8 ^a ±1.39	524.76 ^a ±59.1
	Ort.	349.55±18.12	34.78±5.21	436.83±85.68
	F(çimlenme)	***	ÖD	ÖD

^{a-c} Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($p \leq 0.05$).

F(çimlenme): Çimlenmenin ortalamalar üzerindeki etkisinin önem düzeyi: (ÖD) önemli değil; (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; (***) $p \leq 0.001$

^xGAE: Gallik Asit Eşdeğeri

^yKE: Kuersetin Eşdeğeri

^zTE: Troloks Eşdeğeri

Mineral Bileşimi

Çimlenmiş ve çimlenmemiş darı unlarına ait mineral bileşimi Çizelge 4'te verilmiştir. Tüm darı unlarında potasyum, magnezyum ve fosfor baskın mineraller olmuş ve içerikleri sırasıyla 1353.33-3166.67 mg/kg, 940.02-1146.67 mg/kg ve 250-383.33 mg/kg aralığında değişim göstermiştir. Çimlenme işlemi, farklı renkteki darı tanelerinden elde edilen unların mineral bileşimini önemli düzeyde etkilemiştir. Genel olarak çimlenmiş darı unlarının kalsiyum, magnezyum ve çinko içerikleri çimlenmemiş tanelerden elde edilen unlara kıyasla önemli düzeyde yüksek bulunmuştur. Çimlenme ile mineraller arasında en dikkat çekici artış kalsiyumda olmuştur. Çimlenmemiş kırmızı ve siyah darı ununda kalsiyum elementi belirlenemezken, çimlenme ile bu darı unlarında kalsiyum miktarı sırasıyla 98.33 mg/kg ve 61.00 mg/kg a önemli düzeyde yükselmiştir.

Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının ortalama fosfor içerikleri arasında önemli düzeyde bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ancak beyaz darı unlarının fosfor içeriğinin çimlenme ile az ama önemli düzeyde arttığı bulunmuştur. Benzer şekilde ortalama demir içerikleri çimlenme ile önemli düzeyde düşerken siyah darı unu özelinde çimlenmenin demir içeriğini önemli düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. Tüm darı unlarında çimlenme ile miktarı önemli düzeyde azalan mineral potasyum olmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgulara benzer şekilde Abdelrahman (2007), inci darısında potasyum ve fosforu baskın mineraller olarak bildirmiş ve araştırmacılar 6 günlük çimlenme sonucunda toplam potasyum miktarında önemli düzeyde düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Literatürde bildirilen çalışmalarda çimlenmenin mineraller üzerindeki etkisinin değişiklik gösterdiği görülmektedir.

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Çizelge 4. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının mineral bileşimi (mg/kg YA darı unu)

Örnekler	K	Ca	Mg	P	Mn	Fe	Zn	
Çimlenmemiş	Beyaz	2911.67 ^{b±} 40.72	84 ^{c±} 0.8 7	1035.00 ^c ±5.00	316.67 ^{bc±} 14.43	19.76 ^{a±} 0.21	32.00 ^{c±} 0.66	13.06 ^{c±} 0.98
	Kırmızı	3166.67 ^{a±} 38.84	0.00 ^{e±} 0. 00	940.02 ^{e±} 2.19	508.33 ^{a±} 28.87	13.69 ^{d±} 0.04	51.75 ^{a±} 0.50	23.20 ^{a±} 0.06
	Siyah	2530.00 ^{c±} 5.00	0.00 ^{e±} 0. 00	980.00 ^{d±} 5.00	250.00 ^{c±} 43.30	12.43 ^{e±} 0.08	32.45 ^{c±} 0.21	20.84 ^{b±} 0.14
Ort.		2869.44± 278.93	28.00±4 2.00	985.01±4 1.46	358.33±1 19.24	15.29± 3.39	38.73± 9.78	19.03±4. 62
	Beyaz	1845.00 ^{e±} 13.23	133.33 ^a ±2.89	1116.67 ^b ±2.89	383.33 ^{b±} 28.87	19.44 ^{b±} 0.08	29.49 ^{d±} 0.25	19.95 ^{b±} 0.06
Çimlenmiş	Kırmızı	1933.33 ^{d±} 7.64	98.33 ^{b±} 2.89	1146.67 ^a ±2.89	350.00 ^{b±} 43.30	14.02 ^{c±} 0.12	24.42 ^{e±} 0.3	23.47 ^{a±} 0.1
	Siyah	1353.33 ^{f±} 17.56	61.00 ^{d±} 1.80	1036.67 ^c ±2.89	258.33 ^{c±} 28.87	12.36 ^{e±} 0.03	33.89 ^{b±} 0.12	23.03 ^{a±} 0.12
Ort.		1710.55± 270.88	97.55±3 1.41	1100.00± 49.31	330.56±6 3.47	15.28± 3.20	29.27± 4.11	22.1522 ±1.66
	F(çimlenme)	***	**	***	ÖD	ÖD	*	ÖD

^{a-c}Aynı sütunda farklı küçük harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark istatistiksel açıdan önemlidir ($p \leq 0.05$).

F(çimlenme): Çimlenmenin ortalamalar üzerindeki etkisinin önem düzeyi: (ÖD) önemli değil; (*) $p \leq 0.05$; (**) $p \leq 0.01$; (***) $p \leq 0.001$

Örneğin, Sharma ve ark. (2016), darıdan elde edilen unlarda demir, magnezyum ve kalsiyum içeriklerinin çimlenme ile arttığını bildirirken, Kumar ve ark. (2021), rağı darısında demir ve çinkonun çimlenmeden 96 saat sonra %63.7 ve %16.7 oranında azaldığını bildirmiştir. Benzer bulgular, bakla fasulyesinin 72 saatlik çimlenmesinde de elde edilmiş ve demir ile çinkonun miktarı çimlenme ile sırasıyla %38.2-38.9 ve %24.5-29.2 oranında azalmıştır (Luo ve Xie, 2014). Kayisoglu ve ark. (2024), çimlenme ile beyaz sorgum tanelerinde kalsiyum ve magnezyum seviyelerinde artış bildirirken demir, potasyum ve çinko miktarlarında azalma rapor etmiştir. Bunun aksine, kırmızı sorgum taneleri, çimlenme süresince mineral içeriğinde sürekli bir düşüş sergilemiştir. Mineral içeriğindeki artışlar, çimlenme sırasında aktif olan fitaz enzimi ile ilişkilendirilmiştir. Anti-besinsel maddelerden biri olan fitik asit, güçlü bir şelatlayıcı ajan olarak işlev görerek mineraller ile çözünmez kompleksler oluşturur. Bu nedenle mineral

biyoyararlanımı azalır. Fitaz, fitatı inozitole ve serbest ortofosfata hidrolize ederek, çimlenmiş darı tohumlarında minerallerin serbest kalmasını sağlar (Yousaf, Hou, Liaqat ve Shen, 2021). Ayrıca, çimlenme koşullarındaki değişiklikler, fitaz enziminin aktivitesini etkileyebilir ve bu da fitik asidin parçalanmasını ve dolayısıyla minerallerin serbest kalmasını etkiler. Çimlenme süresinin uzaması, enzim aktivitesinin artmasına ve daha fazla fitik asit parçalanmasına yol açarken, aynı zamanda bazı minerallerin oksidasyonuna ve kaybına da neden olabilir. Öte yandan, çimlenme sırasında uygulanan ıslatma işleminin mineral düzeylerindeki bu azalmadan sorumlu olabileceği rapor edilmiştir (Afify ve ark., 2012).

Bu bağlamda, bu çalışmada elde edilen mineral bileşimi sonuçları, literatürde rapor edilen bulgularla genel olarak uyumlu olup, bazı farklılıklar da göstermektedir. Bu değişikliklerin, çeşitlerin genetik yapıları, çimlenme süresi, çimlenme koşulları ve kullanılan ölçüm yöntemleri gibi faktörlere bağlı

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

olabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, çimlenme sürecinin mineral biyoyararlanımı üzerindeki etkisinin karmaşık ve çeşitlere özgü olduğunu göstermekte, bu nedenle daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

FT-IR

Çimlenmiş ve çimlenmemiş darı unlarının fonksiyonel gruplarını ve yapısal değişikliklerini tespit etmek için 4000-800 cm^{-1} frekans aralığında FT-IR spektroskopisi ile ölçüm yapılmıştır. Örnekler için spektraller Şekil 3'te ve ilgili fonksiyonel gruplar ile geçirgenlik değerleri Çizelge 5'te verilmiştir. Şekil 3'te çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarına ait spektraller karşılaştırılarda kolaylık sağlaması bakımından alt alta verilmiştir. Genel olarak çimlenmemiş beyaz ve kırmızı darı unlarının spektralleri benzer iken, siyah darı unu absorptans yaptığı bantların konumları ve sayısı bakımından farklılıklar göstermiştir. Şekil 3'te görüldüğü gibi tüm örneklerde 3274.92-3278.57 cm^{-1} bölgesindeki geniş bant aralığı ortak olarak bulunmuştur. Bu bant aralığı, nişasta, protein-nişasta etkileşiminden ve su, alkol, fenoller veya karboksilik asitlerden kaynaklanan O-H bağı gerilmelerini temsil etmiştir (Sun ve ark., 2014). Kayisoglu ve ark. (2024)'da çimlenmiş sorgumda bu bant aralığındaki absorptansları O-H ve N-H bağlarının gerilme etkilerinden sorumlu olan nişasta ve protein molekülleri ile ilişkilendirmiştir. Tüm örneklerde ortak bir şekilde gözlenen 2923.41-2925.13 cm^{-1} bölgesindeki asimetrik gerilme ise alken grubundan kaynaklanan C-H bağı ile ilişkilendirilmiştir. 1743,80-1634,81 cm^{-1} bölgesinde gözlenen absorptans bantları ise amin gruplarının (N-H) varlığını işaret edebilir

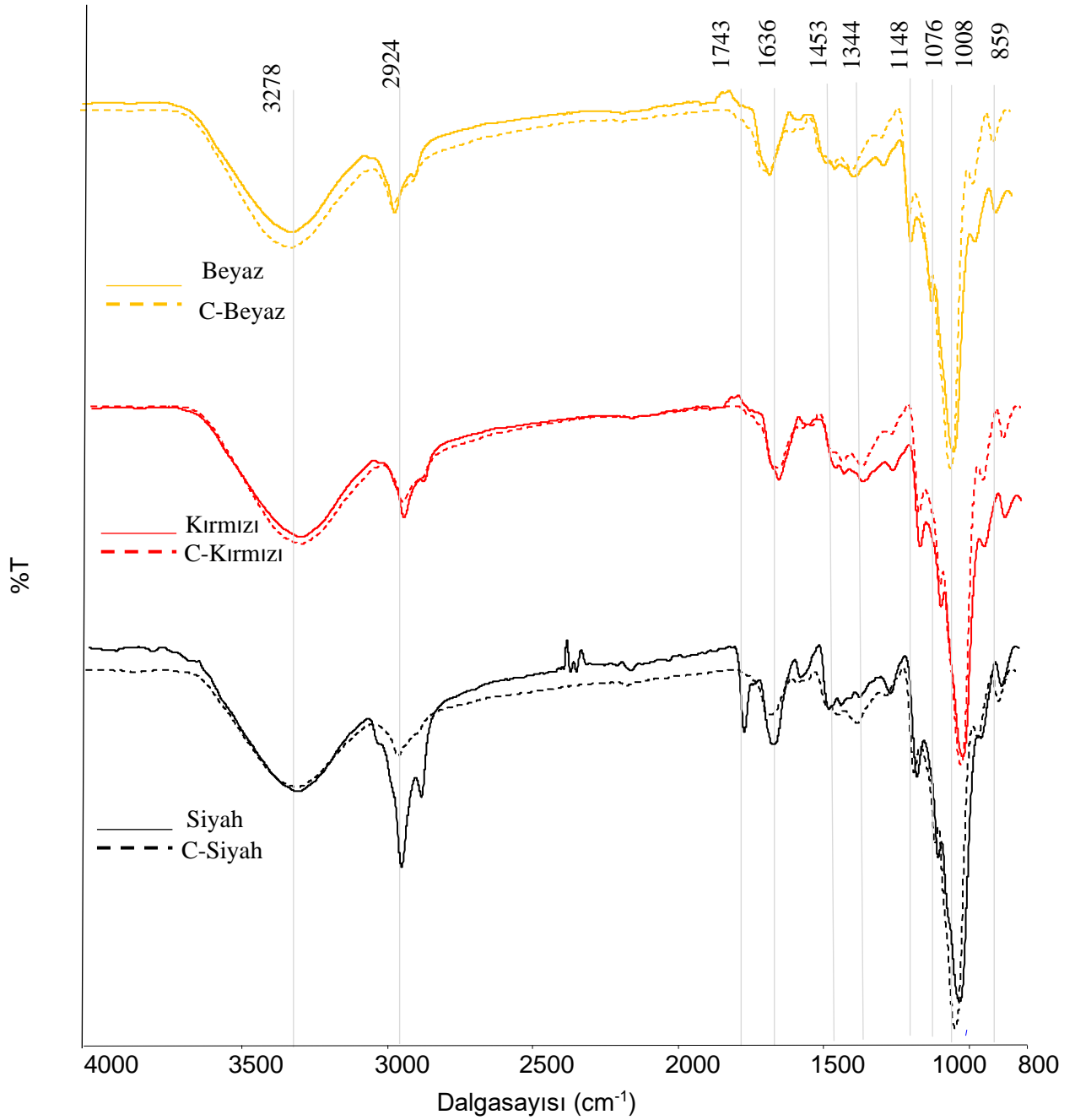
(Navyashree ve ark., 2022). 800-1200 cm^{-1} (parmak izi bölgesi) arasındaki dalga boyu aralığı esas olarak C-C, C-O ve C-H gerilme titreşimlerine karşılık gelir (Siwath ve ark., 2017). Darı un örneklerinde bu bölgedeki absorptanslar 1008 ve 859 cm^{-1} civarındaki pikler ile karakterize olmuştur. 1008 cm^{-1} ana bant 1148 ve 1076 cm^{-1} bölgelerinde iki ayrı pik vermiştir. Bu bantlar sırasıyla nişastanın düzenli ve amorf yapıları ile ilişkilendirilmiştir (Siwath ve ark. 2017). Navyashree ve ark. (2022), beyaz darıda 1149, 1075, 1008 ve 859 cm^{-1} civarındaki absorptansları sırasıyla alkol (C-O), anhidrit (C=O), ester (P-OR) ve alkan (C-H) gruplarının varlığı ile ilişkilendirmiştir. Bu çalışmada da bu bantlarda absorptanslar elde edilmiş ancak örnekler arasında absorptanslar ve absorptans yoğunluğu bakımından farklar ortaya çıkmıştır. Örneklerin 1149-861 cm^{-1} bölgesinde tanımlanan piklerin genişliklerinin ve konumlarının değişmesi, açılmal C-H bağının deformasyonu, esterlerdeki -1-4 glikozidik bağlantıların (C-O-C) ve C-O bağının (sırasıyla protein ve nişastanın -COOH ve O-H grubu arasında oluşur) titreşiminden ve yeni fonksiyonel grupların oluşumundan kaynaklanmış olabilir. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının karşılaştırılması sonucunda, çimlenmiş örneklerdeki absorptans piklerinin konumları ve genişliklerinde gözlenen değişiklikler, nişastanın amiloz ve amilopektin bileşenlerinde meydana gelen dönüşümlere işaret eder. Bu değişiklikler, unun kristal yapısındaki ve nişastanın yapısal özelliklerindeki değişimleri gösterir (Kayisoglu ve ark., 2024). Bu farklılıklar, çimlenme sürecinin darı ununun fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli etkileri olduğunu gösterir.

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Çizelge 5. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının FTIR spektrumu

Pik No	Çimlenmemiş			Çimlenmiş			Fonksiyonel Grup	Referans
	Beyaz Dalgasayısı (cm ⁻¹)	Kırmızı Dalgasayısı (cm ⁻¹)	Siyah Dalgasayısı (cm ⁻¹)	Beyaz Dalgasayısı (cm ⁻¹)	Kırmızı Dalgasayısı (cm ⁻¹)	Siyah Dalgasayısı (cm ⁻¹)		
1	3278,57 (%87.97)	3278,53 (%82.58)	3276,79 (%94.61)	3275,53 (%82.26)	3274,92 (%90.87)	3277,98 (%88.44)	O-H bağı gerilmesi	(Sun ve ark.,2014)
2	2924,46 (%89.75)	2924,72 (%85.14)	2923,41 (%91.18)	2925,07 (%87.42)	2924,78 (%93.41)	2925,13 (%92.30)	Alken grubu (C-H)	(Navyashre e ve ark., 2022)
3	-	-	1743,80 (%97.31)	-	-	-	Esterler, Amin grupları (N-H)	(Navyashre e ve ark., 2022)
4	1634,88 (%93.27)	1636,45 (%90.88)	1647,20 (%96.76)	1637,43 (%91.69)	1640,91 (%96.66)	1637,80 (%95.29)	Amid I, Amin grupları (N-H)	(Navyashre e ve ark., 2022)
5	1347,12 (%93.16)	1344,38 (%93.45)	-	1344,32 (%91.93)	1343,99 (%96.00)	1349,20 (%95.29)		
6	-	-	1453,46 (%98.34)	-	-	-		
7	1148,84 (%87.01)	1148,92 (%87.10)	-	1148,58 (%86.05)	1149,20 (%91.97)	1149,05 (%90.32)	Alkol grubu (C-O)	(Navyashre e ve ark., 2022)
8	-	1076,99 (%79.68)	-	1076,16 (%77.23)	-	-	Anhidritler (C=O)	(Navyashre e ve ark., 2022)
9	1002,19 (%67.49)	1001,52 (%59.91)	1002,39 (%98.34)	-	1008,18 (%71.39)	1005,97 (%67.55)	Esterler (P-OR)	(Navyashre e ve ark., 2022)
10	857,16 (%89.77)	857,99 (%96.17)	-	859,53 (%95.24)	859,53 (%97.74)	-	Alkan (C-H)	(Navyashre e ve ark., 2022)

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi



Şekil 3. Çimlenmemiş ve çimlenmiş darı unlarının FT-IR spektrumları. (Beyaz: Çimlenmemiş beyaz darı unu, Kırmızı: Çimlenmemiş kırmızı darı unu, Siyah: Çimlenmemiş siyah darı unu, C-Beyaz: Çimlenmiş beyaz darı unu, C-Kırmızı: Çimlenmiş kırmızı darı unu, C-Siyah: Çimlenmiş siyah darı unu)

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

Sonuç

Darı türleri kuraklık, olumsuz hava koşulları ve gübre ve böcek ilacı gibi kimyasal girdilere ihtiyaç duymadan yetişebilen, ülkemizde daha çok kuş yemi olarak bilinen küçük taneli gıdalardır. Darı türleri zengin fitokimyasal bileşimi ve sağlığa faydaları nedeniyle günümüzde gıda ve beslenme bilimcilerinin ilgisini çekmektedir. Bu çalışmada, beyaz kırmızı ve siyah darı taneleri 3 gün boyunca çimlendirilip sonrasında bu darılardan un elde edilmiştir. Çimlenmemiş ve çimlenmiş unların kimyasal bileşimi, renk özellikleri, fenolik ve antioksidan potansiyeli ile mineral bileşimi belirlenmiştir. Darı unlarının nem içeriği çimlenme ile azalırken, protein içeriğinde hafif bir artış gözlenmiştir. Çimlenme işlemi, darı unlarının renk özelliklerinde değişikliklere neden olmuş; tüm örneklerin L^* değerlerinde genel bir artış tespit edilmiştir. Çimlenme sürecinin toplam fenolik bileşimde dramatik bir artışa neden olduğu ve bu artışın beyaz, kırmızı ve siyah darı unlarında sırasıyla 4.94, 4.96 ve 2.85 kat olduğu bulunmuştur. Ayrıca, çimlenme sürecinin tüm örneklerde flavonoid içeriğinde ve antioksidan aktivitesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Tüm darı unlarında potasyum, magnezyum ve fosfor baskın mineraller olarak bulunmuş ve çimlenme ile mineraller arasında en çok artış kalsiyumda meydana gelmiştir. Çimlenmenin darı unlarında meydana getirdiği yapısal değişiklikler FT-IR spektroskopisi ile incelenmiş, beyaz ve kırmızı darı unlarının spektrumlarının benzer olduğu ancak siyah darı ununun farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Çimlenme süreci örnekler için spektrumların bazı bantların konumlarında ve genişliklerinde farklılıklara neden olmuştur.

Küresel iklim krizi, kuraklık ve tahıl üretimi arasındaki ilişki tarım sektöründe önemli bir endişe kaynağıdır. Bu nedenle, iklim değişikliğiyle mücadele etmek ve kuraklığa dayanıklı tahıl ve tahıl benzeri tohumların potansiyelini araştırmak sürdürülebilirlik için

önemlidir. Bu çalışma, kuraklık, olumsuz hava koşulları ve kimyasal girdilere ihtiyaç duymadan yetişebilen beyaz, kırmızı ve siyah darının potansiyel kullanımını artırmak açısından son derece önemlidir. Ülkemizde kuş yemi olarak bilinen darının, glutensiz olması nedeniyle çölyak hastaları için de iyi bir alternatif gıda olabileceği düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma, TÜBİTAK 2209-A -Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı kapsamında 1919B012303676 başvuru numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Abdelrahaman, S. M., Elmaki, H. B., Idris, W. H., Hassan, A. B., Babiker, E. E. ve El Tinay, A. H. (2007) Antinutritional factor content and hydrochloric acid extractability of minerals in pearl millet cultivars as affected by germination. *Int J Food Sci Nutr* 58(1):6-17. doi:10.1080/09637480601093236
- Abioye, V. F., Babarinde, G. O., Ogunlakin, G. O., Adejuyitan, J. A., Olatunde, S. J. ve Abioye, A. O. (2022) Varietal and processing influence on nutritional and phytochemical properties of finger millet: A review. *Heliyon* 8(12):e12310. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e12310
- Afify, A. E. M. M. R., El-Beltagi, H. S., El-Salam, S. M. A. ve Omran, A. A. (2012) Effect of soaking, cooking, germination and fermentation processing on proximate analysis and mineral content of three white sorghum varieties (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Not Bot Horti Agrobo* 40(2):92-98. doi:10.15835/NBHA4027930
- Akinola, S. A., Badejo, A. A., Osundahunsi, O. F. ve Edema, M. O. (2017) Effect of preprocessing techniques on pearl millet flour and changes in technological properties. *Int J Food Sci Tech* 52(4): 992-999. doi:10.1111/IJFS.13363
- AOAC. (2016) *Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016*. (Jr. George W. Latimer, Ed.) (AOAC

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

- International., C. 20). https://www.techstreet.com/standards/official-methods-of-analysis-of-aoc-international-20th-edition-2016?product_id=1937367 adresinden erişildi.
- Bazhenova, I. A., Bazhenova, T. S. ve Chernova, E. V. (2019) Germination of proso millet (*Panicum miliaceum* L.) grains trigger biochemical changes that augment bioavailability of flower and its utility for gluten-free dietary foods. *Agron Res* 17(6): 2187-2194. doi:10.15159/AR.19.219
- Bhatt A, Singh V, Shrotria PK, Baskheti DC. (2003) Coarse grains of Uttaranchal: ensuring sustainable food and nutritional security. *Indian Farmer's Digest* 7:34–38.
- Boz, H. (2014) Darı: kimyasal bileşimi ve insan sağlığı açısından potansiyel faydaları. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 9(1):140-146. <https://dergipark.org.tr/en/pub/sduzfd/issue/29590/317469> adresinden erişildi.
- Chukwumah, Y., Walker, L. T. ve Verghese, M. (2009) Peanut skin color: A biomarker for total polyphenolic content and antioxidative capacities of peanut cultivars. *Int J Mol Sci* 10(11): 4941-4952. doi:10.3390/ijms10114941
- Derbew, H., Moges, D. (2017) Effect of germination duration on nutritional and functional properties of sorghum (*Sorghum bicolor*): The case of Girana and Miskr varieties. *Ethiopian J Sci Technol* 10(3): 165-180.
- Dumanoglu, Z., Özdemir, S. ve Kökten, K. (2022) Farklı İnci Darısı (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) Genotiplerine Ait Tohumların Bazı Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *ISPEC J Agric Sci* 6(1). doi:10.46291/ispecjasvol6iss1pp64-71
- FAO (2023) International Year of Millets 2023. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/millets-2023/en> adresinden erişildi. 10 Mayıs 2023 tarihinde erişildi.
- Geren, H., Kır, B. ve Kavut, Y. T. (2019) Farklı biçim zamanlarının tatlı darı (*Sorghum Bicolor* Var. *Saccharatum*) çeşitleri üzerinde verim ve bazı yem kalite unsurlarına etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 56(2):249-255. doi:10.20289/zfdergi.450573
- Goudar, G., Manne, M., Sathisha, G. J., Sharma, P., Mokalla, T. R., Kumar, S. B. ve Ziouzenkova, O. (2023) Phenolic, nutritional and molecular interaction study among different millet varieties. *Food Chem Adv*, 2:100150. doi:10.1016/J.FOCHA.2022.100150
- Gujral, H. S., Angurala, M., Sharma, P., & Singh, J. (2011) Phenolic content and antioxidant activity of germinated and cooked pulses. *International J Food Prop* 14(6): 1366-1374.
- Hassan, Z. M., Sebola, N. A., Mabelebele, M. (2021) The nutritional use of millet grain for food and feed: a review. *Agri Food Sec* 10:1-14.
- James, S., Bagirei, S. Y., James, S. A., Maina, C. Y., Ibrahim-Baba, A., Ilemona, A., & Ozovehe, A. (2022) Total phenolic, flavonoid and antioxidant capacities of processed pearl millet and sorghum flours. *Croat J Food Sci Technol* 14(2): 272-281.
- Jan, N., Hussain, S. Z., Naseer, B. ve Bhat, T. A. (2023) Amaranth and quinoa as potential nutraceuticals: A review of anti-nutritional factors, health benefits and their applications in food, medicinal and cosmetic sectors. *Food Chem X*, 18:100687. doi:10.1016/J.FOCHX.2023.100687
- Kacar, B. ve İnal, A. (2008). Bitki Analizleri. Nobel, Ankara, Türkiye.
- Kaur, H. ve Gill, B. S. (2021). Changes in physicochemical, nutritional characteristics and ATR–FTIR molecular interactions of cereal grains during germination. *J Food Sci Technol* 58(6): 2313-2324. doi:10.1007/S13197-020-04742-6/FIGURES/4
- Kayisoglu, C., Altikardes, E., Guzel, N. ve Uzel, S. (2024) Germination: a powerful way to improve the nutritional, functional, and molecular properties of white- and red-colored sorghum grains. *Foods* 13(5):662. doi:10.3390/FOODS13050662

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

- Kılınçer, F. N. ve Demir, M. K. (2019) Çimlendirilmiş bazı tahıl ve baklagillerin fiziksel ve kimyasal özellikleri. *Gıda* 44(3):419-429. doi:10.15237/gida.GD19019
- Kumar, A., Kaur, A., Gupta, K., Gat, Y. ve Kumar, V. (2021) Assessment of germination time of finger millet for value addition in functional foods. *Curr Sci* 120(2):406-413. doi:10.18520/CS/V120/I2/406-413
- Kumari, S., Bhinder, S., Singh, B. ve Kaur, A. (2023) Physicochemical properties, non-nutrients and phenolic composition of germinated freeze-dried flours of foxtail millet, proso millet and common buckwheat. *J Food Compos Ana* 115:105043. doi:10.1016/J.JFCA.2022.105043
- Li, C., Jeong, D., Lee, J. H. ve Chung, H. J. (2020) Influence of germination on physicochemical properties of flours from brown rice, oat, sorghum, and millet. *Food Sci Biotechnol* 29(9):1223. doi:10.1007/S10068-020-00770-2
- Li, R., Wang, Q., Zhao, G., Peng, H., Zhang, D. ve Li, Z. (2022) Effects of germination time on phenolics, antioxidant capacity, *in vitro* phenolic bioaccessibility and starch digestibility in sorghum. *Int J Food Sci Tech* 57(8):5175-5185. doi:10.1111/ijfs.15827
- Luo, Y. ve Xie, W. (2014) Effect of soaking and sprouting on iron and zinc availability in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). *J Food Sci Technol* 51(12):3970. doi:10.1007/S13197-012-0921-7
- Anonim. (2019) Make the most of millet to attract more birds to your garden - Drakensberg. Pride Milling Company. <https://www.pridemilling.co.za/news/make-the-most-of-millet-to-attract-more-birds-to-your-garden/>, 24 Nisan 2024 tarihinde adresinden erişildi.
- Mamilla, R. K. ve Mishra, V. K. (2017) Effect of germination on antioxidant and ACE inhibitory activities of legumes. *LWT* 75:51-58. doi:10.1016/j.lwt.2016.08.036
- Mikulajová, A., Šedivá, D., Eěrtík, M., Gereková, P., Németh, K. ve Hybenová, E. (2017) Genotypic variation in nutritive and bioactive composition of foxtail millet. *Cereal Research Communications*, 45(3):442-455. doi:10.1556/0806.45.2017.018/METRICS
- Nakilcioğlu-Taş, E., Ötleş, S. (2021) Influence of extraction solvents on the polyphenol contents, compositions, and antioxidant capacities of fig (*Ficus carica* L.) seeds. *SciELO* 93, e20190526.
- Navyashree, N., Singh Sengar, A., Sunil, C. K. ve Venkatachalapathy, N. (2022) White Finger Millet (KMR-340): A comparative study to determine the effect of processing and their characterisation. *Food Chem* 374:131665. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2021.131665
- Nefale, F. E. ve Mashau, M. E. (2018) Effect of germination period on the physicochemical, functional and sensory properties of finger millet flour and porridge. *Asian J Appl Sci* 6(5):2321-0893. doi:10.24203/AJAS.V6I5.5466
- Obadina, A. O., Arogbokun, C. A., Soares, A. O., de Carvalho, C. W. P., Barboza, H. T. ve Adekoya, I. O. (2017) Changes in nutritional and physico-chemical properties of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) Ex-Borno variety flour as a result of malting. *J Food Sci Technol* 54(13):4442-4451. doi:10.1007/S13197-017-2922-Z/FIGURES/1
- Ocheme, O. B. ve Chinma, C. E. (2008) Effects of soaking and germination on some physicochemical properties of millet flour for porridge production. *J Food Technol*, 6(5): 185-188.
- Öktem, A., Öktem, A. G. ve Demir, D. (2021). Geç olum süresine sahip bazı tatlı sorgum (*Sorghum bicolor* var. *saccharatum* (L.) *Mohlenbr.*) genotiplerinin biyokütle verimi ve yem kalitesinin belirlenmesi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi* 7(2):315-325. doi:10.24180/IJAWS.930210
- Parameswaran, K. P., Sadasivam, S. (1994) Changes in the carbohydrates and nitrogenous components during germination of proso millet, *Panicum*

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

- miliaceum*. *Plant Foods Hum Nutr* 45: 97-102.
- Perales-Sánchez, J. X. K., Reyes-Moreno, C., Gómez-Favela, M. A., Milán-Carrillo, J., Cuevas-Rodríguez, E. O., Valdez-Ortiz, A. ve Gutiérrez-Dorado, R. (2014) Increasing the antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents by optimizing the germination conditions of amaranth seeds. *Plant Foods Hum Nutr* 69(3):196-202. doi:10.1007/S11130-014-0430-0/TABLES/2
- Pirzadah, T. B. ve Malik, B. (2020). Pseudocereals as super foods of 21st century: Recent technological interventions. *J Agric Food Res* 2(5):100052. doi:10.1016/j.jafr.2020.100052
- Pradeep, P. M. ve Sreerama, Y. N. (2015) Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. *Food Chem* 169:455-463. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2014.08.010
- Prasad, P., Sahu, J. K. (2023) Effect of soaking and germination on grain matrix and glycaemic potential: A comparative study on white quinoa, proso and foxtail millet flours. *Food Bio* 56: 103105.
- Pushparaj, S., F., Urooj, A. (2014) Antioxidant activity in two pearl millet (*Pennisetum typhoideum*) cultivars as influenced by processing. *Antioxidants* 3(1):55-66.
- RP, M., RB, K., BS, A., BM, P. ve SD, K. (2023) Effects of germination on antinutritional, colour, functional and physicochemical properties of millets. *J Pharm Innov* 12(1):350-355. doi:10.22271/TPI.2023.V12.I1D.18008
- Saleh ASM, Zhang Q, Chen J, Shen Q. (2013). Millet grains: nutritional quality, processing, and potential health benefits. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 12:281-295. doi: 10.1111/1541-4337.12012.
- Saleh, H. M., Hassan, A. A., Mansour, E. H., Fahmy, H. A. ve El-Bedawey, A. E. F. A. (2019) Melatonin, phenolics content and antioxidant activity of germinated selected legumes and their fractions. *J Saudi Soc Agric Sci* 18(3): doi:10.1016/j.jssas.2017.09.001
- Shahidi, F., Chandrasekara, A. (2013) Millet grain phenolics and their role in disease risk reduction and health promotion: A review. *J Func Foods*, 5(2):570-581. doi:10.1016/j.jff.2013.02.004
- Sharma, S., Saxena, D. C. ve Riar, C. S. (2016) Analysing the effect of germination on phenolics, dietary fibres, minerals and γ -amino butyric acid contents of barnyard millet (*Echinochloa frumentaceae*). *Food Bio* 13:60-68. doi:10.1016/J.FBIO.2015.12.007
- Sharma, P., Gujral, H. S. (2010). Antioxidant and polyphenol oxidase activity of germinated barley and its milling fractions. *Food Chem* 120(3):673-678.
- Singleton, V. L. ve Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16(3):144-158.
- Siwath, M., Yadav, R. B. ve Yadav, B. S. (2017) X-ray diffraction, rheological and FT-IR spectra studies of processed amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*). *Food Meas Charact* 11(4):1717-1724. doi:10.1007/S11694-017-9552-Z/FIGURES/4
- Siwela, M., Taylor, J. R., De Milliano, W. A., Duodu, K. G. (2007) Occurrence and location of tannins in finger millet grain and antioxidant activity of different grain types. *Cereal Chem* 84(2):169-174.
- Sokrab, M., Isam, A., Ahmed, M., Babiker, E. (2012) Effect of germination on antinutritional factors, total and extractable minerals of high and low phytates corn (*Zea mays L.*) genotype, *J Saudi Sociology and Agric Sci* 11:123-128. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.02.002
- Soylu, S. (2012). Alternatif bir biyoyakıt bitkisi olarak dallı darının (*Panicum virgatum L.*) Türkiye’de yetiştirme teknikleri. *J Agric Mach* 8(3):257-263.
- Sun, Q., Han, Z., Wang, L. ve Xiong, L. (2014) Physicochemical differences between sorghum starch and sorghum flour

Çimlenmenin Beyaz, Kırmızı ve Siyah Darı (*Pennisetum glaucum*) Ununun Kimyasal Bileşimi, Fenolik ve Antioksidan Potansiyeline Etkisi

- modified by heat-moisture treatment. *Food Chem*, 145:756-764.
doi:10.1016/J.FOODCHEM.2013.08.129
- Tanriseven, D., Kadiroglu, P., Selli, S. ve Kelebek, H. (2020) LC-DAD-ESI-MS/MS-assisted elucidation of the phenolic compounds in shalgams: Comparison of traditional and direct methods. *Food Chem* 305:125505. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125505
- Thakur, P., Kumar, K., Ahmed, N., Chauhan, D., Eain Hyder Rizvi, Q. U., Jan, S., ... Dhaliwal, H. S. (2021) Effect of soaking and germination treatments on nutritional, anti-nutritional, and bioactive properties of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus L.*), quinoa (*Chenopodium quinoa L.*), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum L.*). *Curr Res Food Sci* 4:917-925. doi:10.1016/J.CRFS.2021.11.019
- Xiang, Jinle, Li, W., Ndolo, V. U. ve Beta, T. (2019) A comparative study of the phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of finger millets from different growing regions in Malawi. *J Cereal Sci* 87:143-149. doi:10.1016/j.jcs.2019.03.016
- Xiang, Jinle, Yuan, Y., Du, L., Zhang, Y., Li, C. ve Beta, T. (2023) Modification on phenolic profiles and enhancement of antioxidant activity of proso millets during germination. *Food Chem X*, 18:100628. doi:10.1016/J.FOCHX.2023.100628
- Yenasew, A., Urga, K. (2022) Impact of germination period on mineral and anti-nutritional content of Finger millet varieties. *Heliyon* 4170543.
- Yousaf, L., Hou, D., Liaqat, H. ve Shen, Q. (2021) Millet: A review of its nutritional and functional changes during processing. *Food Res Int* 142:110197. doi:10.1016/J.FOODRES.2021.110197



Research Article

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

Reyhan Selin UYSAL*¹

ABSTRACT

The aged vinegars studied, which are *Sherry* vinegars from Jerez, Spain, with varying aging periods, are protected under the Denomination of Origin (DO). The objectives of this study were to (i) examine the impact of aging on the polyphenolic compound content and color properties of *Sherry* vinegars, and (ii) determine the correlation between phenolic compounds and color properties in these samples. Phenolic compounds were identified and quantified using LC-MS/MS technique, and correlation analysis was conducted between phenolic content and color properties. The results showed a statistically significant decrease in total phenolic content with increased aging. Additionally, all colorimetric properties exhibited significant changes across the samples. A notable shift from yellow to red hues was observed in the vinegars. Significant reductions in caffeic acid and gallic acid content were also found due to aging. This study is the first to analyze the correlation between phenolics and color properties in *Sherry* vinegars, revealing the influence of phenolic compounds on their color characteristics.

Keywords: Sherry vinegar, phenolics, LC-MS/MS, color properties

Yıllandırılmış Sirkelerde Kolorimetrik Özellikler ile Fenolik Bileşikler Arasındaki Korelasyon

ÖZ

Araştırma kapsamında incelenen örnekler, İspanya'nın Jerez bölgesinden farklı yıllandırma sürelerine sahip Menşei Sistemi altında korunan *Sherry* sirkeleridir. Bu çalışmanın amaçları (i) yıllandırmanın *Sherry* sirkelerinin polifenolik bileşik içeriği ve renk özellikleri üzerindeki etkisini incelemek ve (ii) bu örneklerdeki fenolik bileşikler ile renk özellikleri arasındaki korelasyonu belirlemektir. Fenolik bileşikler, LC-MS/MS tekniği kullanılarak tanımlandı ve fenolik içerik ile renk özellikleri arasında korelasyon analizi yapılmıştır. Sonuçlar yıllandırmanın artmasıyla birlikte analiz edilen fenolik içeriğin toplamında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca numuneler arasında tüm kolorimetrik özelliklerde önemli değişiklikler gözlenmiştir. Sirke örneklerinde sarı tonlardan kırmızı tonlara gözle görülür bir geçiş gözlenmiştir. Yıllanmaya bağlı olarak kafeik asit ve gallik asit içeriğinde de önemli azalmalar bulunmuştur. Bu çalışma, *Sherry* sirkelerindeki fenolikler ile renk özellikleri arasındaki ilişkiyi analiz etmiş olup ve fenolik bileşiklerin renk özellikleri üzerindeki etkisini ortaya koyan ilk çalışma olmuştur.

Anahtar kelime: Sherry sirkesi, fenolikler, LC-MS/MS, renk özellikleri

ORCID ID (Yazar sırasına göre)
0000-0003-0028-7286

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 19.05.2024

Kabul Tarihi: 15.06.2024

¹Department of Genetics and Bioengineering, Istanbul Bilgi University, Istanbul, 34060, Turkey

*E-posta: selin.uyosal@bilgi.edu.tr

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

Introduction

Vinegars are one of the important seasoning foods consumed for a long time throughout history (Liang et al. 2016). Vinegars can be primarily categorized into two main types based on differences in raw materials and processing techniques: grain vinegars and fruit vinegars (Xia et al. 2018). Sherry vinegar, Spain's most popular and valuable fruit vinegar, is also one of the most famous vinegars worldwide. It stands as a highly esteemed and top-tier product hailing from the Denomination of Origin (DO) region in the southwestern part of Spain. This prestigious designation, protected by both Spain and the European Union (Tesfaye et al. 2002a). Sherry vinegars crafted within geographically indicated regions, is derived from Sherry wines meticulously produced using the traditional aging method known as "Soleras and Criaderas" (Andalucia and Deporte 2006). This time-honored technique lends a distinctive character and quality to the vinegar, reflecting the rich heritage of the region.

One of the features that make vinegar a unique product is its chemical composition. Phenolic compounds are one of the significant components of vinegar which mostly affect the organoleptic properties and quality. These compounds in vinegar are initially sourced from raw material (grapes) and subsequently wine during acidification process (Cosme et al. 2018). In the fermentation and aging periods, phenolic compounds can undergo some reactions with other compounds of wine such as tannins. These reactions are playing an important role in defining the characteristic properties of vinegars. Color, appearance, flavor and also taste can be changed according to the change in the content and variability of phenolic compounds (Uysal et al. 2023). In addition to phenolic compounds, color properties of vinegar depend on the origin of grape varieties, then fermentation process and type of aging process. Thus, the aging process can be a determinative feature on *Sherry* vinegar because of time and unique process. "*Solera and Criadera*" is a type of production process which is carried out according to a dynamic aging system from the South region of Spain (Valcárcel-Muñoz et al. 2023). Therefore, knowing the chemical process that occurs on the

phenolic components during the production processes of special vinegars is one of the areas that need to be studied in order to reveal the effect of aging and acetification processes and to show how it changes their organoleptic properties.

There have been some studies on the effect of acetification process on phenolics (Andlauer et al. 2000), evaluation of bioactive compounds of Shanxi aged vinegars (Xia et al. 2018), changes in antioxidant components during aging of traditional balsamic vinegar (Verzelloni et al. 2010), correlation of antioxidant and color profile of balsamic vinegars (Sinanoglou et al. 2018), antioxidant characteristics of traditional Zhenjiang vinegars during aging (Zhao et al. 2018), changes in color and phenolic compounds during aging of *Sherry* white wine (Ortega et al. 2003), evaluation of phenolics during experimental aging within 180 days of *Sherry* vinegars (Tesfaye et al. 2002b). As a result of the examination of the studies conducted and to our best knowledge, no study has been found examining the relationship between the phenolic component and organoleptic properties of *Sherry* vinegars, which change with long-term aging period in a wood cask.

The aim of this study is to show how aging affects the relationship between color properties and phenolic component composition of *Sherry* vinegars of different ages. Secondly, this analytical approach aimed to elucidate any potential connections between the color characteristics of the aged vinegars and the concentrations of some phenolic compounds, providing deeper insights into the compositional attributes of the samples.

Materials and Method

Reagents and chemicals

Reagents and chemicals for chromatographic analysis were purchased from Panreac Applichem (Darmstadt, Germany). Myricetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside; quercetin-3-*O*-galactoside; quercetin-3-*O*-rutoside; quercetin-3-*O*-glucuronide; quercetin-3-*O*-glucopyranoside; luteolin-7-*O*-glucoside; caffeic acid, chlorogenic acid, and gallic acid were purchased from Cymit Química (Barcelona, Spain).

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

Samples

Three conventional sherry vinegar samples aged at different years (*Crianza*, *Reserva*, and *Gran Reserva*) were supplied from Sur de Espana (Jerez de la Frontera, Cádiz, Spain). All the samples were supplied in duplicate (from two batches of the same kind of vinegar). The entirety of the sherry vinegar specimens was exclusively crafted utilizing Sherry Wine's provenance within the Protected Designation of Origin (PDO) framework, which entail distinct aging durations as stipulated by the PDO guidelines. The maturation process of sherry vinegar transpires within wooden casks, following the traditional "*Criadera y Solera*" system. Specifically, the examined samples underwent aging within American oak barrels, employing the "*Criadera y Solera*" methodology. As per the specifications outlined by the PDO for sherry wine vinegars, the aging process must adhere to the following guidelines: (i) For *Crianza* vinegars, the aging duration must be at least of 6 months; (ii) Regarding *Reserva* sherry vinegar, the aging period must maintain a minimum of 2 years; (iii) *Gran Reserva* sherry vinegar necessitates an aging period surpassing 10 years. In this study, the aging period of analyzed samples were approximately as follows: *Crianza* (8 months), *Reserva* (3 years), and *Gran reserva* (12 years).

Color properties

The chromatic attributes, encompassing tonality, color intensity, and color density, within the sherry vinegar specimens were evaluated in accordance with the methodology delineated by the International Organization of Vine and Wine (OIV 2022). Absorbance measurements were conducted utilizing a UV/VIS spectrophotometer (PG Instruments T80, UK). The colorimetric features of the vinegar samples were assessed at specific wavelengths, namely 420 nm (representing yellow components), 520 nm (depicting red components), and 620 nm (indicating blue components). Subsequently, calculations for color intensity (CI), tonality (T), and color density (D) were executed utilizing the ensuing formulas:

$$CI = A420 + A520 + A620$$

$$T = A420/A520$$

$$D = A420 + A520$$

The Glories color index percentages corresponding to yellow (Y%), red (R%), and blue (B%) hues present in the vinegars were computed utilizing the spectral data acquired at wavelengths of 420 nm, 520 nm, and 620 nm, respectively (Glories 1984).

Phenolic compounds

Polyphenol composition of the samples was conducted utilizing a Shimadzu LC-MS/MS 8050 triple quadrupole mass spectrometer outfitted with an electrospray ionization (ESI) source. The vinegar samples were filtered through a 0,45 μm pore size membrane filter before injection. The mobile phase utilized for the separation of polyphenols comprised two solvent systems: (i) Solvent A, consisting of water/formic acid (99,9:0,1, v/v), and (ii) Solvent B, comprising acetonitrile/formic acid (99,9:0,1, v/v). A sample volume of 10 μL was injected for analysis. The characterization of individual components was conducted by assessing their retention times and precise molecular masses. Furthermore, concentrations of each compound were determined through external calibration using corresponding standard compounds. To achieve this, stock solutions of all individual standards were prepared with the extractant across a concentration range of 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, and 1 mg L^{-1} . This calibration procedure facilitated the accurate quantification of the concentrations of the target compounds within the sample. The analysis was performed in duplicate.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using XLSTAT Premium 2016 (Addinsoft, New York, NY). One-way analysis of variance (ANOVA) was employed to assess significant differences in colorimetric characteristics and polyphenol compounds among the vinegar samples.

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

Subsequently, Tukey's multiple range tests were applied as a post-hoc analysis, with significance typically inferred when the resulting p -value was below 0,05. Furthermore, a correlation analysis was undertaken to investigate potential relationships between the colorimetric parameters of vinegars and the levels of polyphenols. Correlation coefficients resulting from this analysis were reported to ascertain the degree of association between these variables.

Results and Discussion

Color properties

Color intensity (CI), tonality (T), color density (D), and percentages of yellow, red, and blue hues (%) in vinegar samples were measured using a spectrophotometer. The specific values for each colorimetric parameter of the samples are provided in Table 1. As can be seen from the table, the highest yellow characteristics and the lowest red tones of the samples were found for *V1* (*Crianza*, 8 months) sample with the percentages of 65.70% and 24.93%, respectively. The lowest yellow and the highest red color were also obtained for *V2* (*Reserva*, 3 years) sample with the amount of 60.50% and 28.57%.

On the other hand, the yellow and red components of the most aged *V3* (*Gran Reserva*, 12 years) sample were calculated as the percentage of 62.51 and 26.83, respectively. As can be seen from the table, an increase in the absorbance values of A420nm and A520nm was observed for the samples of *V2* and *V3* compared to *V1*. These changes observed in the yellow (decrease in the amount) and red pigments (increase in the percentage) during the aging process of samples (from *V1* to *V2* and *V3*) can be attributed to browning reactions such as Maillard. Especially the initial decrease in the sample of *V1* to *V2* may be released due to amino acids may involve in different reactions which result in the formation of Maillard compounds and the similar change in browning was observed in another research studied by (Palacios et al. 2002).

The formation of these browning compounds during the aging period resulted in color change leading to an increase in CI (4,68%) and D (4,17%) values for *V2* sample. A similar change for CI (4,45%) and D (3,97%) values was obtained for *V3* sample. On the other hand, although there was a statistically significant difference between the samples of *V1-V2* (from 9,38% to 10,93) and *V1-V3* (from 9,38% to 10,66%) in blue tones, not much change was observed in the percentage of the color component.

The significant color change in yellow and red components, and the slight change in blue component can be considered as a result proving that these non-enzymatic reactions occur during the aging process. The reactions described play a significant role in the notable increase in total absorbance (CI) observed during the physicochemical phase, as outlined in Table 1. These reactions contribute to the enhancement of the color properties. Similarly, browning in color and an increase in red tone were also observed in Shanxi vinegar, another example of traditional aged vinegar having geographical indication (PGI) certificate which is produced in Shanxi Province, China (Zhu et al. 2020). Most of the brown-colored compounds that can be formed by caramelization along with Maillard are melanoidins (Bozkurt et al. 1999).

The formation of the basic structure of melanoidins is related to the formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and furfural during aging (Delgado-Andrade and Morales 2005, Tagliazucchi et al. 2010). In vinegar characterized by high sugar concentrations and low water content, the formation of HMF and furfurals occurs even under ambient conditions, including room temperature (Yang et al. 2014). A notable disparity in tonality values was observed between the *V1-V2* and *V1-V3* samples. This discrepancy can be attributed to an increase in absorbance values at 520 nm (A520nm) and intensification of red coloration due to browning compounds.

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

Table 1. Colorimetric characteristics of wine-vinegar (V) samples

Vinegar Type	A ₄₂₀ [¶]	A ₅₂₀ [¶]	A ₆₂₀ [¶]	CI	Tonality	D	Y [¶] (%)	R [¶] (%)	B [¶] (%)
ANOVA [†]	***	***	***	***	***	***	***	***	***
V1 (8 M [‡])	2,053 ± 0,01 c	0,779 ± 0,02 c	0,293 ± 0,03 c	3,13 ± 0,02 c	2,64 ± 0,01 a	2,83 ± 0,01 c	65,70 ± 0,03 a	24,93 ± 0,05 c	9,38 ± 0,06 b
V2 (3 Y [‡])	2,829 ± 0,01 a	1,336 ± 0,01 a	0,511 ± 0,01 a	4,68 ± 0,01 a	2,12 ± 0,02 c	4,17 ± 0,02 a	60,50 ± 0,04 c	28,57 ± 0,06 a	10,93 ± 0,07 a
V3 (12 Y)	2,779 ± 0,02 b	1,193 ± 0,02 b	0,474 ± 0,01 b	4,45 ± 0,02 b	2,33 ± 0,01 b	3,97 ± 0,01 b	62,51 ± 0,06 b	26,83 ± 0,04 b	10,66 ± 0,05 a

*, **, ***, significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively. Mean values obtained from the triplicate analysis of all vinegar samples. Values followed by the same letter, within the same row, were not significantly different ($p > 0.05$), according to Tukey's least significant difference test. CI: Color intensity, D: Color density, Y[¶]: yellow (%), R: red (%), B: blue (%), M[‡]: month, Y[‡]: year.

Phenolic compounds

In addition to colorimetric properties, phenolic compounds in vinegar samples were analyzed using LC-MS/MS. The concentrations of these phenolic compounds in all vinegar samples are presented in Table 2. It is evident from the table that most of the phenolic compounds were initially found at high concentrations in the V1 sample, with subsequent decreases observed during the aging period. For instance, the concentration of Quercetin-O-3-glucoside was 45,21 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in the V1 sample but was not detected (ND) in the V3 sample. A significant reduction was also noted in the content of Quercetin-O-3-glucuronide from 1029,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in V1 to 61,51 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in V3. Furthermore, notable differences were observed between V1-V2 and V1-V3 samples for gallic acid and caffeic acid. The concentration of gallic acid decreased from 641,19 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in V1 to 219,97 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in V2 and 200,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in V3. Conversely, for caffeic acid, the concentrations were determined as 1049,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 213,98 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and 95,58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for V1, V2, and V3 samples, respectively. These findings highlight dynamic changes in the phenolic composition of vinegar samples during the aging process, which may contribute to alterations in chemical profiles.

Statistically significant results were found for total phenolic compounds between the samples. While at least aged sample (V1) has the highest phenolic compound content (2896,06), the most aged sample (V3) has the less content of

phenolic compounds (296,18). Moreover, there is a significant change between the samples of V1 and V2 with a content of 990,71 (V2). The total phenolic compounds result shows a high relation between aging period and the content of phenolics.

On the other hand, as Luteolin-7-O-glucoside was found in a very small amount but also decrease during aging period was observed from 5,26 (V1) to 1,72 (V3). Quercetin-3-O-rutinoside cannot be detected (ND) in all samples. While chlorogenic acid, one of the phenolic acids, was not seen (ND) in the V1 and V3 samples, it was seen in the amount of 115,85 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in the V2 sample. Eriodictin and hesperidin compounds from flavanones were also found in the amount of 88,16 and 64,63 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively in only V2 sample.

In another study, a similar change and progressive loss in phenolic compounds, especially monomeric flavanols such as catechin, has been observed during traditional balsamic vinegar. It was also stated in the study that some reactions involving flavonoids and tannins may lead to subsequent polycondensation of other flavonoid molecules. As a result of these reactions, while a decrease was observed in monomeric flavonoids in aging of traditional balsamic vinegar, an increase was also detected in polymeric phenolic compounds.

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

Table 2. Mass spectral characteristics and concentration of phenolic compounds ($\mu\text{g Kg}^{-1}$) present in the vinegar samples.

Code	Compound	[M - H] ⁻ (m/z)	MS/MS (m/z)	ANOVA [†]	V1	V2	V3
<i>Flavones</i>							
1	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	448,90	†287,10 /153,10	*	5,26 ± 0,01 a	2,72 ± 0,05 b	1,72 ± 0,01 b
<i>Flavanones</i>							
2	Eriotricin	595,20	287,05 /150,09	***	‡ND b	88,16 ± 0,01 a	ND b
3	Hesperidin	609,20	301 /163,90	***	ND b	64,63 ± 0,01 a	ND b
<i>Flavonols</i>							
4	Myricetin-3- <i>O</i> -glucoside	481,10	319,10 /273,10	***	28,56 ± 0,02 b	45,09 ± 0,01 a	28,67 ± 0,01 b
5	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	463,25	300,15 /271,15	*	45,21 ± 0,03 a	26,12 ± 0,01 b	ND c
6	Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide	478,95	303,05 /229	***	1029,05 ± 0,02 a	144,43 ± 0,01 b	61,51 ± 0,02 b
7	Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside	465	303,10 /229,1	***	61,90 ± 0,01 a	38,75 ± 0,02 b	ND c
8	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	608,90	301/ 299,95	NS	ND a	tr [¶] a	ND a
9	Quercetin-3- <i>O</i> -glucopyranoside	463,10	300,95/ 300	***	35,09 ± 0,02 a	31,01 ± 0,02 a	ND b
<i>Phenolic acids and derivatives</i>							
10	Gallic acid	169,10	124,95 /124,30	NS	641,19 ± 0,01 a	219,97 ± 0,03 b	200,6 ± 0,03 b
11	Chlorogenic acid	353,30	191,05 /92,95	NS	ND b	115,85 ± 0,01 a	ND b
12	Caffeic acid	179,10	135 /134/106,95	***	1049,8 ± 0,02 a	213,98 ± 0,01 b	95,58 ± 0,01 b
	Total of polyphenolic compounds			***	2896,06 ± 0,04 a	990,71 ± 0,02 b	296,18 ± 0,02 c

[†]The m/z values of the dominant ions are highlighted using bold font. [¶]tr: trace. [‡]ND: not detected. [§]NS: not significant at $p < 0,05$; *, **, ***, significant at $p < 0,05$, $p < 0,01$, and $p < 0,001$, respectively. Mean values obtained from the duplicate analysis of all vinegar samples. Values followed by the same letter, within the same row, were not significantly different ($p > 0,05$), according to Tukey's least significant difference test.

During aging of balsamic vinegar, the amount of total polyphenols decreased from 1500,6 mg/kg to 1321,4 mg/kg (Verzelloni et al. 2010). The formation of some of the phenolic compounds (such as Eriotricin, hesperidin or flavonols; myricetin-3-*O*-glucoside) in V2 samples (in three years) during aging may be explained by the extraction of phenolic compounds from the oak butt (Tesfaye et al. 2002a).

Correlation between color properties and phenolic compounds

Pearson's correlation analysis was conducted to examine the relationship between the color properties (such as color intensity, density, percentages of colors (yellow, red, and blue) and

the phenolic compounds (Quercetin-*O*-3-glucuronide, Quercetin-*O*-3-galactoside, gallic acid, caffeic acid, and total phenolics) in all vinegar samples. Table 3 presents the correlation coefficient matrix of this analysis between the color parameters and phenolic compounds. A statistically significant ($p < 0,05$) positive relationship was observed, indicating high correlation coefficients between certain phenolic compounds such as Quercetin-3-*O*-glucuronide-caffeic acid ($r=0,999$); Quercetin-3-*O*-glucuronide-gallic acid ($r=0,999$); gallic acid-caffeic acid ($r=0,997$).

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

Table 3. Pearson correlation coefficients matrix among the color properties and phenolic compounds determined in the samples

Variables	Y (%)	R (%)	B (%)	CI	D	Quercetin-3-O-glucuronide	Quercetin-3-O-galactoside	Gallic acid	Caffeic acid	Total phenolic
Y (%)	1***[†]	-0,995	-0,974	-0,968	-0,968	0,891	0,488	0,908	0,874	0,794
R (%)	-0,995	1***	0,945	0,936	0,936	-0,839	-0,394	-0,859	-0,818	-0,725
B (%)	-0,974	0,945	1***	1,000*	1,000*	-0,971	-0,674	-0,980	-0,962	-0,911
IC	-0,968	0,936	1,000*	1***	1,000**	-0,977	-0,692	-0,984	-0,968	-0,922
D	-0,968	0,936	1,000*	1,000**	1***	-0,977	-0,692	-0,984	-0,968	-0,921
Quercetin-3-O-glucuronide	0,891	-0,839	-0,971	-0,977	-0,977	1***	0,831	0,999*	0,999*	0,983
Quercetin-3-O-galactoside	0,488	-0,394	-0,674	-0,692	-0,692	0,831	1***	0,809	0,850	0,918
Gallic acid	0,908	-0,859	-0,980	-0,984	-0,984	0,999*	0,809	1***	0,997*	0,975
Caffeic acid	0,874	-0,818	-0,962	-0,968	-0,968	0,999*	0,850	0,997*	1***	0,989
Total phenolic	0,794	-0,725	-0,911	-0,922	-0,921	0,983	0,918	0,975	0,989	1***

[†]Values in bold font are statistically significant *, **, and *** at $p < 0,05$, $0,01$, and $0,001$, respectively.

The decrease in the amounts of these flavonol components and phenolic acid components in the vinegar samples over the aging period contributes to their correlation with each other. Although a decrease in the Quercetin-3-O-galactoside component is observed due to aging, a correlation with a high coefficient may not have been found due to its small amount. Based on the findings, it can be inferred that all free mono-phenolic compounds underwent a series of reactions, leading to their disappearance or presence in very low amounts in the vinegar sample.

A significant positive correlation was observed among some color properties of the vinegar samples. Specifically, a high positive correlation was noted between blue pigment–color intensity ($r = 1,000$) and blue pigment-density ($r = 1,000$). Similarly, the color intensity and density of the samples exhibited a highly significant and positive correlation ($r = 1,000$). These correlation findings align with the earlier observations regarding changes in blue (%), color intensity, and density properties of the vinegar samples as the aging period increases. Although a strong negative correlation (with $r = -0,995$) was observed in yellow and red colors, it was not found to be statistically significant.

No statistically significant relationship was detected between (i) color properties and (ii) phenolic compounds. This absence of correlation could potentially be attributed to little increase in

yellow (%) pigment (from 60,50 to 62,51) and minor decline in red (%) pigment (from 28,57 to 26,83) between V2-V3 samples during aging. This observed small decrease in the red color pigment may be due to the polymeric components formed after the condensation reactions of tannins with phenolics during the long aging process (V3 sample) and the tannins losing their effect (A520, V2-1,336 and V3-1,193) on the red color pigment slightly. In addition, another phenolic component that is effective in color along with tannins in grapes and then wine is anthocyanins (Singleton 1969). It has been observed in studies that as the amount of anthocyanin decreases due to aging or vinification, there is a shift from red color to more yellow color (Almela 1993, Pascu 2005, Alcalde-Eon et al. 2006, Uysal et al. 2023). Moreover, it has been reported that the concentration of monomeric anthocyanins decreases during acetification process of vinegars because of polymerization reactions (Cerezo et al. 2010). Therefore, although the concentration of some phenolic compounds decreases, the slight change in color can be explained by the low level of anthocyanins. In a study, the browning measurement (absorbance at 420 nm) of traditional balsamic vinegar (TBV) was studied during the aging period and some colorless and yellowish compounds were determined because of phenolic reactions (Verzelloni et al. 2010). The formation of

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

colorless polymers in TBV has been explained by flavonoids polymerization reaction catalyzed by acetaldehyde. Besides, formation of new colored-yellowish oligomers and polymers has been also explained that glyoxylic acid might promote flavonoid polymerization (Es-Safi et al. 2002). In conclusion, in this study, as mentioned in the previous section, a decrease in the amount of some phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids) was observed because of condensation and polymerization reactions, but the effect of these phenolic compounds on color change was not found to be statistically significant. It is evident that the aging period influences some phenolic compounds of vinegar samples, leading to transformations in their organoleptic properties. Notably, there is a lack of studies in the literature focusing on "Sherry" vinegar that simultaneously assess aging time, phenolic profile, and color properties. This highlights the potential for further research in this area to enhance our understanding of vinegar composition and quality.

Conclusion

In this study, color properties (pigments (%), color intensity, tonality, and density), phenolic compounds, and correlation of color properties-phenolics of *Sherry* vinegars during the aging process were examined. The results showed that the contents of phenolic compounds and color properties changed during the aging period of vinegar samples. The percentage of red pigment increased while the percentage of yellow pigment decreased during aging up to 12 years. It was revealed that a long period of aging in wood casks facilitated Maillard reactions resulting in a different pigmentation with browning compounds. Twelve phenolic compounds were identified, and a high negative correlation was observed between the content of total phenolic compounds and the aging period of vinegar samples. While the aging period of the samples increased, a decrease in the content of some phenolic compounds was observed. As a result, the aging period of Sherry vinegars caused a significant change from yellow to red tone, and a decrease in the amount of monomeric phenolic compounds. This study could serve as a catalyst for future research on Sherry vinegars,

particularly in exploring other organoleptic properties and chemical profiles.

Acknowledgement

Reyhan Selin Uysal thanks to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (TUBITAK-BIDEB 2219, International Postdoctoral Research Fellowship Program) for postdoctoral fellowship. Reyhan Selin Uysal also thanks Prof. Ángel A Carbonell-Barrachina and Prof. Esther Sendra for their support with the analyses.

References

- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. (2006) Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta* 563(1-2):238-254.
- Almela, L., Javaloy, S., Fernandez-Lopez, J. A., Roca, J. M. (1993). Color de los vinos varietales producidos en la Region de Murcia. *Química Agrícola y Alimentaria, European Federation of Chemical Engineering*. 101:205-212.
- Andalucía, J. D. A., Deporte, A. Y. (2006) Consejería de Agricultura y Pesca. *Guía de Certificación de la Producción Ecológica*.
- Andlauer, W., Stumpf, C., Fürst, P. (2000) Influence of the acetification process on phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem.* 48(8):3533-3536.
- Bozkurt, H., Göğüş, F., Eren, S. (1999) Nonenzymic browning reactions in boiled grape juice and its models during storage. *Food Chem.* 64(1):89-93.
- Cerezo, A. B., Cuevas, E., Winterhalter, P., Carmen Garcia-Parrilla, M., Troncoso, A. M. (2010) Anthocyanin composition in Cabernet Sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food Research International* 43(6):1577-1584.
- Cosme, F., Pinto, T., Vilela, A. (2018) Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages* 4(1):22.

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

- Delgado-Andrade, C., Morales, F. J. (2005) Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. *J. Agric. Food. Chem.* 53(5):1403-1407.
- Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., Moutounet, M. (2002) Role of Aldehydic Derivatives in the Condensation of Phenolic Compounds with Emphasis on the Sensorial Properties of Fruit-Derived Foods. *J. Agric. Food. Chem.* 50(20):5571-5585.
- Glories, Y. (1984) The colour of red wines. *Conn. Vigne Vin* 18:195-217.
- Liang, J., Xie, J., Hou, L., Zhao, M., Zhao, J., Cheng, J., Wang, S., Sun, B.-G. (2016) Aroma constituents in Shanxi aged vinegar before and after aging. *J. Agric. Food. Chem.* 64(40):7597-7605.
- OIV (2022). Compendium of international methods of wine and must analysis. International Organisation of Vine and Wine. Paris, France. 154:196.
- Ortega, A., Lopez-Toledano, A., Mayen, M., Merida, J., Medina, M. (2003) Changes in color and phenolic compounds during oxidative aging of sherry white wine. *J. Food Sci.* 68(8):2461-2468.
- Palacios, V., Valcárcel, M., Caro, I., Pérez, L. (2002) Chemical and biochemical transformations during the industrial process of sherry vinegar aging. *J. Agric. Food. Chem.* 50(15):4221-4225.
- Pascu, L. (2005) Red wine quality establishing on the basis of chromatic properties. *Revista de Chimie* 56(7):703-707.
- Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P., Fotakis, C., Kalogeropoulos, N., Sakellari, A., Karavoltos, S., Strati, I. F. (2018) On the characterization and correlation of compositional, antioxidant and colour profile of common and balsamic vinegars. *Antioxidants* 7(10):139.
- Singleton, V. L. (1969) Phenolic substances in grapes and wine, and their significance. *Advances in Food Research* 1:159-166.
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Conte, A. (2010) Contribution of melanoidins to the antioxidant activity of traditional balsamic vinegar during aging. *J. Food Biochem.* 34(5):1061-1078.
- Tesfaye, W., García-Parrilla, M., Troncoso, A. (2002a) Sensory evaluation of Sherry wine vinegar. *J. Sens. Stud.* 17(2):133-144.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M. (2002b) Evolution of phenolic compounds during an experimental aging in wood of Sherry vinegar. *J. Agric. Food. Chem.* 50(24):7053-7061.
- Uysal, R. S., Issa-Issa, H., Sendra, E., Carbonell-Barrachina, Á. A. (2023) Changes in anthocyanin pigments, trans-resveratrol, and colorimetric characteristics of Fondillón wine and other “Monastrell” wines during the aging period. *European Food Research and Technology* 249(7):1821-1831.
- Valcárcel-Muñoz, M. J., Guerrero-Chanivet, M., del Carmen Rodríguez-Dodero, M., Butrón-Benítez, D., de Valme García-Moreno, M., Guillén-Sánchez, D. A. (2023) Analytical and chemometric characterization of sweet Pedro Ximénez Sherry wine during its aging in a criaderas y solera system. *Foods* 12(9):1911.
- Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., Conte, A. (2010) Changes in major antioxidant compounds during aging of traditional balsamic vinegar. *J. Food Biochem.* 34(1):152-171.
- Xia, T., Yao, J., Zhang, J., Duan, W., Zhang, B., Xie, X., Xia, M., Song, J., Zheng, Y., Wang, M. (2018) Evaluation of nutritional compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of Shanxi aged vinegars during the aging process. *J. Food Sci.* 83(10):2638-2644.
- Yang, L., Wang, X., Yang, X. (2014) Possible antioxidant mechanism of melanoidins extract from Shanxi aged vinegar in mitophagy-dependent and mitophagy-independent pathways. *J. Agric. Food. Chem.* 62(34):8616-8622.
- Zhao, C., Xia, T., Du, P., Duan, W., Zhang, B., Zhang, J., Zhu, S., Zheng, Y., Wang, M., Yu, Y. (2018) Chemical composition and antioxidant characteristic of traditional and industrial Zhenjiang aromatic

Correlation Between Colorimetric Properties and Phenolic Compounds in Aged Vinegars

vinegars during the aging process.

Molecules 23(11):2949.

Zhu, H., Falcone, P. M., Qiu, J., Ren, C.-Z., Li, Z.-G. (2020). Effect of ageing on rheological properties and quality of Shanxi aged vinegar. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing.



Research Article

Potential Application of Chitosan Based Edible Coating Combined with Pomegranate and Lemon Peel Phenolic Extract on Apple and Kiwifruit Slices: Physical, Chemical and Sensory Characteristics

İrem Burun¹, Gozde Kutlu^{2*}, Fatih Tornuk^{1,3}

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the impact of different coatings, namely neat chitosan and chitosan combined with pomegranate and lemon extract, on the quality of apple and kiwifruit slices during 21 days of storage at 8°C, and the results were compared to the control samples (uncoated). Results showed that dry matter content of control samples was initially lower than that of the coated ones, while it increased during the storage. Phenolic added chitosan coatings consistently resulted in higher dry matter levels than neat chitosan. During storage, pH values ranged from 4.40 to 4.74 for apple slices and from 3.68 to 4.05 for kiwifruit slices, respectively. The pH value of the control samples was higher on the 7th day compared to the initial measurement, and then gradually decreased for both apple and kiwifruit slices. Chitosan alone slightly increased apple slices' pH, while the combination of chitosan+phenolic extracts decreased it. Uncoated apple slices experienced ongoing weight loss of up to 6.64%, compared to 2.93% for kiwifruit slices during storage, indicating a higher rate of weight loss in apples than in kiwifruits. Furthermore, negative weight loss was observed in the coated fruits. Coating applications caused significant changes in L^* , a^* and b^* values, with kiwifruit slices consistently exhibiting lower color values compared to apples. No visual fungal decay was observed in any sample during the storage. Uncoated samples had higher sensory scores at the beginning of the storage while coating application provided better scores as the storage progresses, showing the preservative effect of the chitosan-based coating on the fruit slices. Overall, this study confirmed that coating of kiwifruit and apple slices with chitosan or chitosan + lemon/pomegranate phenolics could provide better quality and longer shelf life.

Keywords: Postharvest, fruit preservation, chitosan, coating.

Elma ve Kivi Dilimlerinde Nar ve Limon Kabuğu Fenolik Ekstraktı ile Birleştirilmiş Kitosan Bazlı Yenilebilir Kaplamanın Potansiyel Uygulaması: Fiziksel, Kimyasal ve Duyusal Özellikler

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, kitosan ve kitosan + nar ve limon ekstraktı kullanımının, elma ve kivi dilimlerinin kalitesi üzerine etkisini, kaplanmamış örneklerle karşılaştırarak 21 gün boyunca 8°C'de değerlendirmektir. Elde edilen bulgular, depolama süresince kitosan kaplaması ve kitosan+fenolik ekstrakt kombinasyonunun kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında elma ve kivi dilimlerinin kuru madde içeriğinin arttırdığını göstermiştir. Fenolik eklenmiş kitosan kaplamalar, saf kitosan kaplamaya göre daha yüksek kuru madde içeriğine sahiptir. Depolama süresince, pH değerleri elma dilimleri için 4,40 ile 4,74 arasında iken kivi dilimleri için 3,68 ile 4,05 arasında değişmiştir. Kontrol örneklerinin pH değeri, elma ve kivi dilimleri için başlangıçtaki ölçüm sonuçlarına göre 7. günde daha yüksek seviyededir ve daha sonra her iki dilim için de bu değerler kademeli olarak azalmıştır. Yalnızca kitosan kullanımı, elma dilimlerinin pH değerini hafifçe arttırmış, fenolik ekstraktların kitosan ile birlikte kullanımı ise pH değerini azaltmıştır. Kaplanmamış elma dilimlerinde depolama süresince %6,64'e kadar olan bir ağırlık kaybı yaşanırken bu oran kivi dilimlerinde %2,93'tür. Bu da elmaların kivilerden daha yüksek bir ağırlık kaybı oranına sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, kaplanmış meyvelerde negatif ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Kaplama uygulamaları L^* , a^* ve b^* değerlerinde

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 17.05.2024

Kabul Tarihi: 25.06.2024

¹ Yıldız Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Food Engineering, Davutpasa Campus, Istanbul, Türkiye.

² Ankara Medipol University, Faculty of Fine Arts, Design and Architecture, Department of Gastronomy and Culinary Arts, Ankara, Türkiye.

³ Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, 58140 Sivas, Türkiye.

*E-posta: gozcelk@gmail.com

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

önemli değişikliklere neden olmuş, kivi dilimleri sürekli olarak elmalara göre daha düşük renk değerleri sergilemiştir. Herhangi bir örnekte gözle görülür bir küf oluşumu gözlemlenmemiştir. Kaplanmamış örnekler depolamanın başlangıcında daha yüksek duyuşsal puanlar alırken kaplama uygulanan örnekler depolama ilerledikçe daha iyi puanlar almıştır. Bu da kitosan tabanlı kaplamanın meyve dilimleri üzerindeki koruyucu etkisini göstermektedir. Genel olarak, bu çalışma, elma ve kivi dilimlerinin kitosan, kitosan+limon/nar fenolik ekstraktları ile kaplanmasının daha iyi kalite ve daha uzun raf ömrü sağlayabileceğini doğrulamıştır.

Anahtar kelimeler: Hasat sonrası, meyve koruma, kitosan, kaplama.

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0009-0008-0043-3670, 0000-0001-7111-1726, 0000-0002-7313-0207

Introduction

The susceptibility of fruits to decay, their sensitivity to low temperatures, and their overall perishability, caused by rapid ripening and softening, pose limitations on their storage, handling, and transportation capabilities (Abbasi et al., 2009). The application of edible coatings on the surface of fruits, combined with cold storage, is a promising method for extending their shelf life, maintaining quality, protecting against postharvest diseases, and minimizing losses of these highly perishable fruits (Badawy et al., 2017). The Food and Drug Administration (FDA) and the United States Department of Agriculture (USDA) define "fresh" and "minimally processed" products as fruits and vegetables that are freshly cut, washed, packaged, and maintained at refrigerator temperature (De Corato, 2019). Minimally processed fruits and vegetables are also described as "maintained products" because they naturally offer a high standard of quality, characterized by genuine freshness and a rich content of essential nutrients such as minerals, fiber, vitamins, and antioxidants (De Corato, 2019).

Chitosan (CS, 2-amino-2-deoxy-D-glycopyranose), derived from chitin (2-acetamide-2-deoxy-D-glycopyranose) through a process called deacetylation, is a natural polysaccharide (Gomes et al., 2020). CS, an USFDA (the United States Food and Drug Administration)-approved "Generally Recognized as Safe" (GRAS) food additive, is widely used in the food industry. Its

application is attributed to its mucoadhesiveness, biocompatibility, biodegradability, non-toxicity, non-immunogenicity, and its proven ability to inhibit various fungal pathogens affecting plants (Atlar et al., 2024; Badawy et al., 2017; Feyzioglu & Tornuk, 2016; Gomes et al., 2020; Kutlu, 2021). When applied as a coating on fruits and vegetables, CS creates a semi-permeable barrier that slows down respiration and ripening of freshly cut fruit. Consequently, these coatings help minimize moisture loss, weight loss, and contribute to maintaining the overall quality (Badawy et al., 2017). Films and edible coatings are described as thin layers of material that create a protective barrier around edible items, allowing them to be ingested with the coated product (Abbasi et al., 2009).

The peels of vegetables and fruits, often discarded as waste, have the potential to serve as valuable additives due to their antifungal and antimicrobial properties, making them suitable for inclusion in coating formulations (Nair et al., 2018). Lemons are rich in essential natural nutrients, including phenolic compounds (e.g. eriocitrin, coumarins, limonoid glycosides) dietary fiber, essential oils, and carotenoids. Recent evidence suggests that lemons possess antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory features, contributing to their beneficial impacts on overall health (Xi et al., 2017). The pomegranate peel is widely recognized as a rich source of phenolic acids, flavonoids, and tannins

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

(including ellagitannins like punicalagin and punicalin). These compounds have attracted significant interest and favour for the development of novel antimicrobials due to their potential health benefits and wide range of biological functions (Singh et al., 2019). The simultaneous use of CS and extracts from fruit processing by-products holds the potential not only to enhance the value of these materials but also to advance the development of innovative and eco-friendly fruit protective technologies (Gomes et al., 2020). There have been numerous studies in the literature concerning the coating of apples (Qi et al., 2011; Liu et al., 2016; Garrido Assis et al., 2011) and kiwifruit slices (Kaya et al., 2016; Guroo et al., 2021) with CS. Nevertheless, upon reviewing previous studies in the literature, it was found that there were no available scientific studies on the physical, chemical, and sensory attributes of apple and kiwifruit slices coated with pomegranate (PPE) and lemon peel phenolic extract (LPE) combined with CS as an edible coating. In this context, the present study was undertaken (i) to prepare edible coatings formulated with CS and phenolic rich extracts from pomegranate and lemon peel, and (ii) to determine the effects of these coatings, including only CS and CS-phenolic extracts, compared to uncoated apple and kiwi fruits, on some physical, chemical and sensory properties.

Material and method

Materials

High molecular weight chitosan was obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Fresh pomegranate (*Punica granatum* L.) peels were obtained from local pomegranate juice sellers, while lemon (*Citrus limon* Burm.) peels were collected as household waste. The peels were rapidly transferred to the laboratory and dried in a fan-assisted oven (Memmert UF-110, Germany) at 40°C for 18 h. The peels were then ground using a coffee grinder to provide powders and

stored at +4°C in polyethylene plastic bags until extraction.

Fresh apple (*Pyrus malus* L.) and kiwifruits (*Actinidia deliciosa* cv. 'Hayward') were obtained from a local supermarket in Istanbul (Türkiye) and immediately transported to the laboratory. After peeling, the fruits are sliced at room temperature with a sharp stainless-steel knife with a thickness of 1 cm and an average weight of 1 g.

Extraction of phenolic compounds from lemon and pomegranate peels

A mixture containing 25% lemon peel and 75% pomegranate peel, totaling 900 g of ground peels, was mixed with distilled water at a ratio of 1/9 (w:v). The mixture was stirred at 200 rpm using a magnetic stirrer (IKA C-MAG HS 7, Germany) at room temperature for 24 h. Subsequently, centrifugation (Thermo Scientific, Centrifuge Multifuge X3 FR) was performed. The resulting supernatant was obtained and freeze-dried in a lyophilizer (Christ β 1,8-LSC plus, Martin Christ GmbH, Osterode am Harz, Germany) to obtain the dried extracts.

Preparation of coating solution

The CS-based coating solution was prepared by dissolving CS at a concentration of 2% (w:v, decided by preliminary experiments) in diluted acetic acid (1%, v:v) containing 0.05 g/100 ml of Tween 80, with pH values adjusted to 5.6 using 1 mol/L NaOH. After complete dissolution, the phenolic extract consisting of LPE and PPE was added to the CS solution at a 1% ratio and mixed using a magnetic stirrer for 6 h at room temperature and coating solutions were obtained. A neat chitosan coating solution without the extract was also prepared.

Coating of kiwi and apple slices

The fruit slices were directly immersed in the prepared coating solution at room temperature for 2-3 min, and then applied

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

coating was left wet for a few min after draining the slices. Subsequently, the fruit slices were dried in an oven at 35°C for 18 h. The coated fruits were stored at 8°C for 21 days in plastic storage containers 85–90% relative humidity for the further analyses. Fruit samples were coded as follows: CA, uncoated apple slices; CCA, apple slices coated with neat chitosan; PCCA, apple slices coated with chitosan+phenolic extract; CK: uncoated kiwifruit slices; CCK, kiwifruit slices coated with neat chitosan; and PCCK, kiwifruit slices coated with chitosan+phenolic extract. On the 0th, 7th, 14th, and 21st days of storage, the fruit samples were analyzed.

Characterization of coated fruit slices

Determination of dry matter content

The gravimetric method was used to determine the dry matter content of the samples (3 g). The difference of weights of fruit samples before and after drying at 105°C for 18 h was calculated and given as percentage (AOAC International, 2002).

pH determination

For determination of pH values of the fruit slices, 10 g of the sample was weighed, and combined with 90 g of distilled water. The mixture was homogenized using a high-shear homogenizer (Ultra Turrax, Daihan, HG-15D), and the pH values of the fruit samples were measured directly by immersing the pH-meter probe in the mixture at ambient temperature (Mannozi et al., 2017).

Weight loss

The fruit samples were weighed on the 0th, 7th, 14th, and 21st days, and the weight loss was given as percent (AOAC, 1994).

Color measurement

A Hunter Lab Colorflex (CFLX 45–2 Model Colorimeter, Hunter Lab, Reston, VA) was used to measure the L^* (lightness), a^*

(redness/greenness), and b^* (yellowness/blueness) values of the samples (Mannozi et al., 2017).

Visual observation of fungal decay

The fruit samples were visually inspected on the 0th, 7th, 14th, and 21st days of storage to identify any signs of fungal decay. They were considered infected if a visible lesion was observed (Benhabiles et al., 2013).

Sensory analysis

The sensory properties of the fruit samples were examined on days 0, 7, 14, and 21. A hedonic scale ranging from 1 to 5 was used to evaluate the texture, taste, and odor of the samples by the panelists (n=8) (Han et al., 2006).

Statistical evaluation

The findings, derived from a minimum of three parallel analyses, were presented as mean \pm standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) (Student's t test; $p < 0.05$) was performed using JMP Statistical Software version 6 (SAS Institute, Cary, NC) to determine the significant differences between the data (Kutlu et al., 2024).

Results and Discussion

Dry matter contents

During the 21 days of storage, the dry matter contents of CA, CCA, and PCCA samples ranged from 75.4% to 86.2% (Figure 1a). The dry matter contents of the CA samples increased until the 7th day, remained nearly constant on the 7th and 14th days, and showed a significant increase on the 21st storage day compared to other tested storage days. On the other hand, CCA and PCCA exhibited similar trends in dry matter changes during storage. According to this trend, the dry matter decreased until the 14th day and remained almost constant between the 14th and 21st days. In a related study, Mannozi

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

et al. (2021) evaluated the effects of different coating methods (dipping and spraying) and coating solutions (alginate, 5% and 10%) on the fresh-cut mellons. They found a significant decrease in the moisture content of coated fresh-cut melons over 11 days. Moreover, Mannozi et al. (2017) studied the effects of various coatings (pectin and/or sodium alginate) on blueberries and found that the dry matter content tended to rise over 14 storage days in both untreated and coated samples. However, in the study by Mannozi et al. (2018), blueberry fruits coated with chitosan + proanthocyanidins showed no statistically significant changes in dry matter content over 14 days, whereas in chitosan-coated samples, there was a slight increase until the 10th day and a decrease on the 14th day.

During the storage duration, the dry matter contents for CK, CCK, and PCKK samples were as follows: CK ranged from 65.3% (0th day) to 74.1% (21st day), CCK ranged from

75.8% (21st day) to 77.4% (0th and 7th day), and PCKK ranged from 76.8% (21st day) to 78.6% (0th day) (Figure 1b). The dry matter contents of CK samples increased until the 7th day, remained nearly stable on the 7th and 14th days, and increased again on the 21st day. The dry matter contents of CCK and PCKK samples decreased until the 14th day, and although there was a slight increase between the 14th and 21st days, this increase was found to be statistically insignificant ($p > 0.05$). Accordingly, the coated kiwifruit slices showed greater stability in terms of changes in dry matter content during storage compared to the control samples. These results showed that the dry matter content of both apple and kiwifruit slices increased when they were only subjected to CS coating or when they were coated with a combination of phenolic extracts and CS, compared to the control samples. This rise can be due to the the presence of coating materials (CS/ CS+phenolic extracts) in coated fruits (Mannozi et al., 2018).

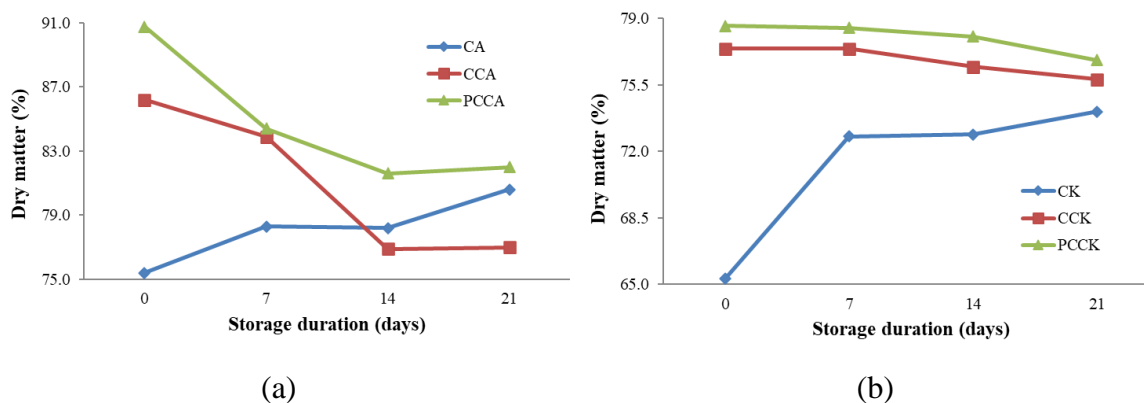


Figure 1. Dry matter content of apple (a) and kiwifruit samples (b) during 21 days of storage.

pH

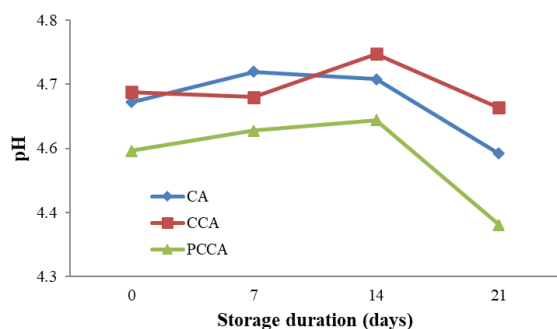
The optimal pH for maximum PPO activity ranges from approximately 4 to 7, and this can vary depending on factors such as the fruit part from which the enzyme is

extracted, the extraction method used, and the specific substrate involved (Rocha et al., 1998). In many studies, the optimal pH for apple PPO is reported to be between 4.5 and 5.0, while other studies indicate the presence

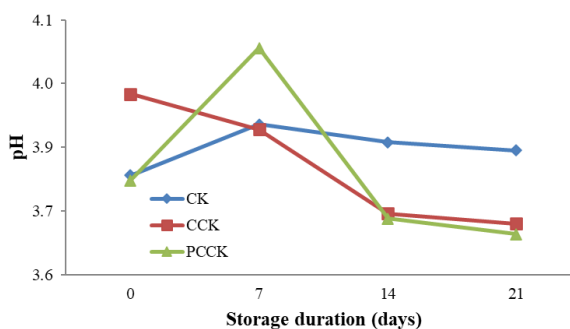
Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

of two separate optimum points, around pH 5.0 and 7.0 (Yoruk & Marshall, 2003). Throughout the 21-day storage period, the pH levels of CA, CCA, and PCCA samples ranged from 4.54 to 4.70, 4.63 to 4.74, and 4.40 to 4.61, respectively as illustrated in Figure 2a. The differences observed in pH values during storage were found to be statistically significant ($p < 0.05$). During the storage period, PCCA samples had the lowest pH values, while CCA samples (except on the 7th day) had the highest pH values. That is, in comparison to the control, the use of CS alone as a coating material slightly increased the pH, while the addition of phenolic extracts to the coating formulation resulted in a slight decrease in

pH, showing that CS coating in apple slices controlled the pH variations at 8°C. In other words, CCA samples effectively postponed fruit senescence during the storage period in comparison to other samples. This could be attributed to the formation of a semi-permeable CS film on the fruit's surface, which likely altered the internal atmosphere, specifically the inherent CO₂ and O₂ levels, thereby slowing down the ripening process (Abbasi et al., 2009). Previously, Kumar et al. (2021) reported that as fruits and vegetables were stored, their pH typically decreased over time, primarily due to delayed utilization of organic compounds as well as an increase in respiration rate and acidity.



(a)



(b)

Figure 2. pH values of apple (a) and kiwifruit samples (b) during 21 days of storage.

Acidity is the primary factor that affects the taste of fruits (Manzoor et al., 2021). As depicted in Figure 2b, the pH levels of CK, CCK, and PCKK samples varied within the ranges of 3.80-3.90, 3.70-4.0, and 3.68-4.05, respectively, during the 21-day storage period. The differences in pH values were found to be statistically significant ($p < 0.05$). While the pH value was higher in CCK samples compared to the CK and PCKK on the 0th day of storage, the highest pH level was observed in PCKK samples on day 7. While the pH value of the uncoated samples was the highest at 14th and 21st days, this

value was the lowest in PCKK samples. Similarly, Huang et al. (2017) coated Chinese kiwifruits with salicylic acid and/or chitosan and evaluated pH changes over 14 days compared to control samples. According to the findings, the highest pH value was reached in the control samples on Day 6, while the increase in pH in the coated samples was reported to be lower compared to the control sample. Likewise, Manzoor et al. (2021) used different nanoemulsion coating formulations (alginate/carboxymethylcellulose, vanillin, ascorbic acid) for improving the shelf life of fresh cut

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

kiwi. They reported that at day 7 of storage, the control fruit exhibited the most significant pH increase, reaching 3.90. Moreover, on the 14th and 21st days, the observation of the lowest pH values in PCKK samples was attributed to the inhibition of organic acids' decomposition. This inhibition was believed to occur due to the combined effects of chitosan and phenolic extracts containing LPE and PPE, which exhibit antioxidative and respiration-inhibiting properties (Fozzi et al., 2022; Jodhani & Nataraj, 2021).

Weight loss

The loss of weight in vegetables and fruits is a good index of quality degradation, which in turn impacts their marketability (Nair et al., 2018). The act of cutting and peeling

fruits such as apples leads to swift alterations in their color and appearance, while skinless fruit slices experience gradual moisture and weight reduction over time. This decrease in weight, which inevitably occurs when the fruit's surface lacks protection, is a factor that detrimentally impacts the product's quality (Chauhan et al., 2011; Cofelice et al., 2019). CA samples demonstrated weight losses of 2.97% at the end of 7 days, 4.54% at the end of 14 days, and 6.64% at the end of 21-days. Meanwhile, CCA samples showed weight increases of 0.52% after 7 days, 2.33% after 14 days, and 6.14% after 21-days. In terms of PCCA samples, their weights increased by 0.44% after 7 days, 2.06% after 14 days, and 4% after 21-days (Table 1).

Table 1. Percent weight loss values of apple and kiwi-fruit slices during 21 days of storage.

Samples	Weight loss (%)			
	0 th day	7 th day	14 th day	21 th day
CA	0.00±0.00 ^{Aa}	2.97±1.90 ^{Ab}	4.54±2.01 ^{Ab}	6.64±0.02 ^{Aa}
CCA	0.00±0.00 ^{Aa}	-0.52±0.01 ^{Ba}	-2.33±0.58 ^{Ba}	-6.14±0.09 ^{Ba}
PCCA	0.00±0.00 ^{Aa}	-0.44±0.01 ^{Ba}	-2.06±0.80 ^{Bb}	-4.00±0.01 ^{Bb}
CK	0.00±0.00 ^{Aa}	2.25±0.20 ^{Aa}	2.89±0.03 ^{Aa}	2.93±0.09 ^{Aa}
CCK	0.00±0.00 ^{Aa}	-0.92±0.08 ^{Ba}	-1.88±0.01 ^{Cb}	-2.12±0.08 ^{Bb}
PCKK	0.00±0.00 ^{Aa}	-0.66±0.08 ^{Ba}	-1.62±0.08 ^{Ba}	-1.92±0.02 ^{Bb}

CA: Uncoated apple; CCA: Apple with chitosan coating; PCCA: Apple with chitosan+phenolic extract coating; CK: Uncoated kiwifruit; CCK: Kiwifruit with chitosan coating; PCKK: Kiwifruit with chitosan+phenolic extract coating.

The lowercase letters indicate the statistical difference among samples of the same fruit variety, while the uppercase letters represent the statistical difference during the storage period (p<0.05).

s

CK samples experienced weight losses of 2.25% after 7 days, 2.89% after 14 days, and 2.93% after 21-days. The amount of weight loss in the control samples was higher in apple samples compared to kiwi fruits during the storage period. The duration of storage also led to an increased weight loss ratio, as previously reported by Abbasi et al. (2009). The primary reason for the highest weight loss observed in untreated control

fruits could be attributed to their elevated rates of respiration and transpiration (Shiri et al., 2013). That is, since the uncoated pericarp lacked a protective barrier, it allowed heat to transfer from the surrounding environment into the fruit slices, resulting in water loss (Lin et al., 2011). On the other hand, CCK samples exhibited weight gains of 0.92% after 7 days, 1.88% after 14 days, and 2.12% after 21-

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

days. PCCK samples showed weight increases of 0.66% after 7 days, 1.62% after 14 days, and 1.92% after 21-days (Table 1). Likewise, it was reported that the incorporation of different compounds into the edible coatings altered their water vapor permeability (Ali et al., 2015; Nair et al., 2018). Additionally, weight gain can occur due to the fact that some coating materials, such as CS, have the ability to absorb water (Dutta et al., 2009). This phenomenon aided in regulating the formation of free water within kiwifruits (Huang et al., 2017). Moreover, Kyriakidou et al. (2021) found that incorporating PPE into CS films decreased their moisture adsorption capacity, particularly in environments with intermediate and high relative humidity values ($a_w > 0.4$), likely because of the hydrophobic nature of the extracted phenolics from the pomegranate peel. This led to the absorption of water on the surface of the coated fruits, consequently resulted in weight gain. In a related study, Howard and Griffin (1993) observed no weight loss in minimally processed carrot sticks after 15 days of storage at 2.5°C. This was likely attributed to the high relative humidity inside the package, which slowed down moisture loss and tissue dehydration.

Color attributes

The color of products like apple slices serves as a significant indicator of quality, with brown apple slices being visually undesirable. This discoloration occurs as a result of oxidative reactions involving phenolic compounds catalyzed by polyphenol oxidase, leading to the formation of o-quinones and their subsequent polymerization into various compounds (Lee et al., 2003). Figure 3 provides a summary of the color properties for both coated and uncoated apple and kiwi samples. The L^* value represents the brightness level, ranging from 0 to 100 to signify darkness to lightness (Atlar et al., 2024). On the other

hand, the a^* value measures the intensity of the green-to-red color spectrum, where a higher positive value indicates a stronger presence of red (Yavuz et al., 2022). Similarly, the b^* value indicates the intensity of the blue-to-yellow color spectrum, with a higher positive value indicating a greater presence of yellow (Demirkan et al., 2024). CA samples exhibited a range of L^* values from 64.6 to 67.6 during the storage period. A decrease in lightness was observed for CA samples over time, except for the 7th and 14th days when no significant changes in L^* values were noticed. Among the CCA samples, the highest L^* value of 73.2 was recorded on Day 0, while the lowest L^* value of 47.5 was observed on Day 21. Lightness increased as the storage period advanced for CCA samples. The L^* values for PCCA samples showed an increase with the progression of the storage period, ranging from 59.6 to 69.9. Hence, the color of PCCA samples became lighter as the storage duration increased. According to Lin et al. (2011), respiration generated bio-heat, leading to an increase in the temperature of the fruit group, which in turn accelerated water loss and browning.

The a^* values of samples named CA (8.7-11.7) decreased until the 14th day, and then slightly increased on the 21st day. Regarding the samples CCA (8.3-16.5), there was a significant increase in redness until the 7th day, reaching its highest level. The redness slightly decreased on the 14th day and further decreased on the 21st day. Among the apple samples, the lowest redness on the 0th day was measured in the CCA samples, while the highest a^* value at the end of storage was also observed in the same samples. For the PCCA (8.2-13.6) samples, the highest level of redness was measured on the 0th day, and the lowest a^* values were observed on the 7th day. Subsequently, although the redness did not reach the initial value (0th day) during the other storage periods (14th and 21st days),

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

it increased to some extent. In earlier findings, it was stated that lower L^* values and higher a^* values were indicative of increased browning (Lee et al., 2003). The results of the study showed that the least pronounced browning occurred in PCCA, while the darkest coloration was observed in CCA on different storage days. In other

words, the application of phenolic extracts inhibited browning due to their reducing power. Furthermore, while CS alone was insufficient in preventing apple browning, its combination with phenolic compounds had synergistic effects in inhibiting browning.

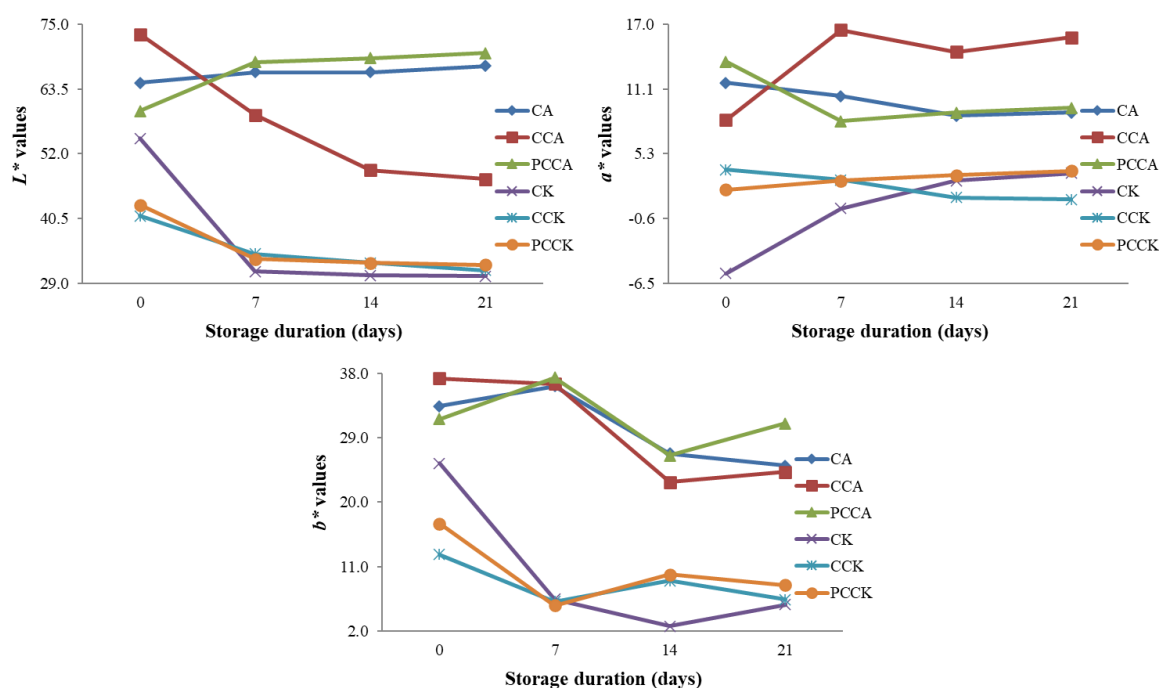


Figure 3. Color properties of apple and kiwifruit slices during 21 days of storage.

Regarding the b^* values of CA samples (25.2-36.2) (Figure 3) there was an increase in yellowness until the 7th day, followed by a decrease in yellowness throughout the rest of the storage period. In the case of CCA samples (22.8-37.3) (Figure 3), there was a significant decrease in yellowness until the 14th day, but a slight increase in yellowness was observed towards the end of storage (21st day). PCCA samples (26.5-37.4) (Figure 3), on the other hand, exhibited a different trend in the measured b^* values compared to the other apple samples, showing fluctuations throughout the storage

period. However, at the end of storage, the b^* values were nearly the same as the initial values. The results indicated that CS coating initially increased the level of yellowness, but after 21 days, the samples with the lowest yellowness were still found in CCA.

Similar to CCA samples, the L^* values measured during the storage period for CK (30.24-54.7), CCK (31.3-41.0), and PCKK (32.3-42.9) samples followed a comparable trend, indicating an increase in darkness compared to the initial value. The darkening of kiwifruit slices during storage occurred due to the emergence of translucent

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

symptoms rather than enzymatic browning. This was attributed to the fact that kiwifruits had low levels of tannin and polyphenol oxidase (Chiabrando et al., 2018). Furthermore, Park & Luh (1985) reported that the acidic nature of kiwifruit also suppressed PPO activity. Except for Day 0, the coated kiwifruit slices had a brighter color compared to the uncoated kiwifruit slices on the other storage days.

Regarding the CK samples, a^* values ranged from -5.6 to 3.5. On the 0th day of storage, greenness was dominant, but by the 7th day, the color shifted towards red, and this trend continued in the subsequent storage days. In contrast to CK and PCK samples, the CCK samples exhibited a decrease in a^* values (ranging from 1.1 to 3.8) with an increase in storage time. On the other hand, the PCK samples showed an increase in a^* values from 2.0 to 3.7 as the storage duration increased.

The b^* values were determined for CK samples (2.7-25.4), CCK samples (6.1-12.7), and PCK samples (5.6-17.0). The highest yellowness values were measured on the 0th day, but by the 7th day, there was a sharp decrease in yellowness. Fluctuations continued in the following storage days. However, compared to the initial values, the storage duration resulted in a significant decrease in yellowness for the kiwi samples.

Visual examination of fungal decay

Freshly cut fruits serve as ideal environments for microbial proliferation due to their expansive cut surface area, allowing water and nutrients to seep from injured tissues, thus rendering them highly prone to decay by microorganisms (Manzoor et al., 2021). In the present study, no visual mold formation and growth were observed in any of the non-coated and coated apple and kiwifruit slices. CS is extensively documented for its potent and bioactive

fungicidal properties; numerous studies have provided evidence of the antifungal effectiveness of both natural and fungal-derived CS against a diverse range of pathogenic fungi (Tayel et al., 2010; Tayel et al., 2016). In addition to its antimicrobial properties, chitosan coating also inhibits polyphenol oxidase activity, thus preventing enzymatic deterioration of the fruit and reducing both respiration rate and weight loss (Kaya et al., 2016). Moreover, PPE was found to contain a significant number of phenolic compounds, particularly punicalagins, which are classified as ellagitannins and have been demonstrated to possess antifungal properties (Nicosia et al., 2016). LPE contains flavonoids, which belong to a group of secondary metabolites known for their potent antioxidant properties (Jodhani & Nataraj, 2021).

Sensory properties

The taste scores of both coated and uncoated apple samples ranged from 2 to 5 as shown in Table 2. Accordingly, the highest taste scores were obtained on day 0. However, with an increase in storage time, there was a significant decrease in these scores. After 21 days of storage, no significant difference was observed between the tested samples ($p>0.05$), while the PCCA samples significantly obtained the highest taste score (3.0). As expected, sliced apple samples obtained the highest odor score on day 0, while these scores were at their lowest level on day 21. The highest odor scores after 21 days of storage were observed in PCCA samples (3.4). In terms of texture scores of apple slices, the scores for CA ranged from 3.60 to 4.40, and they decreased with the increase in storage duration. However, this decrease was not statistically significant ($p>0.05$). The texture evaluation results of CCA samples were found to be 2.80 on days 0 and 7, and 3.00 on days 14 and 21. However, the slight increase was also not

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

statistically significant ($p > 0.05$). On the other hand, PCCA samples slightly decreased from 4.20 to 3.40 on day 7 and then remained unchanged during the storage period. This slight decrease can be due to acid hydrolysis of the pectic acid, which resulted in increased softness (Lee et al., 2003). For apple slice samples, the application of CS or CS+phenolic extracts

did not have any negative effect on taste, or texture throughout the 3-week storage period. Our findings align with those of De Leon-Zapata et al. (2015), who similarly observed that the application of candelilla wax coating infused with fermented tarbush extract on apples did not result in any unfavorable alterations in their appearance and taste over an 8-week storage period.

Table 2. Sensory properties of apple and kiwifruit samples during 21 days of storage.

Sensory properties	Samples	Sensory scores			
		0 th day	7 th day	14 th day	21 th day
Taste	CA	5.00±0.00 ^{Aa}	4.20±0.84 ^{Aa}	2.80±0.84 ^{Ba}	2.00±0.71 ^{Ca}
	CCA	4.40±0.89 ^{Aa}	4.20±0.84 ^{Aa}	3.20±0.84 ^{Ba}	2.40±0.55 ^{Ca}
	PCCA	4.20±1.30 ^{Aa}	3.80±0.84 ^{Aa}	3.60±0.55 ^{Ba}	3.00±1.00 ^{Ca}
	CK	4.00±1.00 ^{Aa}	3.80±1.10 ^{Aa}	3.80±1.10 ^{Aa}	2.60±0.55 ^{Ba}
	CCK	4.60±0.55 ^{Aa}	4.40±0.89 ^{Aa}	4.00±1.00 ^{Aa}	3.20±1.10 ^{Ba}
	PCCK	4.60±0.89 ^{Aa}	4.20±0.84 ^{Aa}	3.40±1.34 ^{Aa}	2.80±0.84 ^{Ba}
Odor	CA	4.60±0.55 ^{Ab}	4.00±1.00 ^{ABb}	3.00±0.71 ^{Bb}	1.80±0.84 ^{Cb}
	CCA	3.40±1.52 ^{Ab}	3.00±0.71 ^{ABb}	2.80±0.84 ^{Bb}	2.20±0.84 ^{Cb}
	PCCA	4.20±0.84 ^{Aa}	4.40±0.55 ^{ABa}	4.20±0.45 ^{Ba}	3.40±0.55 ^{Ca}
	CK	4.40±0.89 ^{Aa}	4.40±0.89 ^{ABa}	3.20±0.84 ^{BCa}	2.60±0.55 ^{Ca}
	CCK	4.40±0.55 ^{Aa}	3.40±1.14 ^{ABa}	3.80±0.84 ^{BCa}	3.20±0.84 ^{Ca}
	PCCK	4.60±0.55 ^{Aa}	4.20±0.45 ^{ABa}	4.00±0.00 ^{BCa}	3.60±0.55 ^{Ca}
Texture	CA	4.40±0.55 ^{Aa}	3.80±0.84 ^{Aa}	3.80±0.84 ^{Aa}	3.60±0.55 ^{Aa}
	CCA	2.80±0.84 ^{Ab}	2.80±0.84 ^{Ab}	3.00±1.00 ^{Ab}	3.00±1.00 ^{Ab}
	PCCA	4.20±0.84 ^{Aa}	3.40±0.55 ^{Aa}	3.40±0.55 ^{Aa}	3.40±0.55 ^{Aa}
	CK	4.80±0.45 ^{Aa}	4.20±0.84 ^{Aa}	4.40±0.55 ^{Aa}	4.20±0.45 ^{Aa}
	CCK	4.40±0.89 ^{Aa}	4.40±0.89 ^{Aa}	4.20±0.84 ^{Aa}	4.20±0.84 ^{Aa}
	PCCK	4.60±0.55 ^{Aa}	4.60±0.55 ^{Aa}	4.40±0.55 ^{Aa}	4.00±1.00 ^{Aa}

*The lowercase letters indicate the statistical difference among samples of the same fruit variety, while the uppercase letters represent the statistical difference during storage period ($p < 0.05$).

The taste scores of coated and uncoated kiwi samples ranged from 2.60 to 4.60 (Table 2). There was not much variation in taste scores for kiwi samples between 0 and 14 days, but after 21-days of storage, the lowest scores were obtained. However, no significant difference was found among tested kiwi samples after 21-days of storage ($p < 0.05$). Possible variations in acidity, pH, and sugar/acid ratio of fruit samples could be

contributing factors to these fluctuations in taste scores (Abbasi et al., 2009).

Regarding the odor characteristics of kiwifruit slices, similar to apple samples, the highest ratings were determined on day 0. These values decreased until the end of the storage day. The highest odor scores after the end of storage were obtained by CCK and PCCK samples. However, no statistical difference was found between tested

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

kiwifruit samples stored for 21 days ($p > 0.05$).

Firmness in fruits and vegetables is consistently indicative of freshness and quality, and the loss of texture contributes to fruit softening, resulting in decreased consumer demand (Nair et al., 2018). For kiwifruit samples, the highest texture score level was observed on day 0. There were slight fluctuations in the texture scores of CK during the storage period; however, these fluctuations were statistically non-significant ($p > 0.05$). The texture evaluation results of CCK samples were found to be 4.40 on days 0 and 7, and 4.20 on days 14 and 21, with a statistically insignificant decrease ($p > 0.05$). For PCKK samples, texture scores remained unchanged on days 0 and 7, while an increase in storage time led to a decrease in these scores; however, this decrease was not statistically significant ($p > 0.05$). The combination of phenolic extracts and CS led to retardation of softening in kiwifruit slices until 14 days of storage. This phenomenon can be attributed to the restricted microbial load, as well as decreased respiration rate and moisture loss (Nair et al., 2018).

Conclusion

The findings showed that the coating process had different effects on the dry matter content and pH value of the apples during storage. Furthermore, based on sensory analysis, apples coated with CS+phenolic extract were superior in terms of aroma and odor compared to other, suggesting positive effects during storage. However, CS+phenolic extract coated apple slices showed increased browning compared to CS-coated and uncoated slices. In the case of kiwi fruit, the coated samples showed a different effect in terms of dry matter content, pH and weight loss compared to the control ones. During storage, all kiwifruit samples exhibited a slight darkening and less yellowness in color attributes. Browning

was most pronounced in samples treated with phenolic extract+CS and least in CS-coated kiwifruit. No visual observation of fungal decay was detected in any of the apple and kiwifruit slices, both coated and non-coated. In terms of taste, CS-coated kiwifruits and CS+phenolic extracts-coated kiwifruits received the highest preference, while in terms of odor and texture, CS+phenolic extracts-coated kiwifruits obtained the highest liking. In conclusion, the application of CS+phenolic extract as active coatings on a large scale are viable to preserve some quality attributes of apple and kiwifruit slices.

Acknowledgments

This work was supported by The Scientific and Technological Research Council of Türkiye (TUBITAK). Grant/ Award Number: 1919B012003845

References

- Abbasi, N. A., Iqbal, Z., Maqbool, M., & Hafiz, I. A. (2009). Postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L.) fruit as affected by chitosan coating. *Pakistan Journal of Botany*, 41(1), 343-357.
- Ali, A., Noh, N. M., & Mustafa, M. A. (2015). Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. *Food packaging and shelf life*, 3, 56-61.
- AOAC, (1994), Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists, 1111 North 19th Street, Suite 20, 16th Edi. Arlington, Virginia USA (1994), p. 22209
- AOAC International, (2002), Official methods of analysis (OMA) of AOAC International, 17th Edition,

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

- USA, Method number: 920.15, Available at: <http://www.eoma.aoac.org/>
- Atlar, G. C., Kutlu, G., & Tornuk, F. (2024). Design and characterization of chitosan-based films incorporated with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for active packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127732.
- Badawy, M. E., Rabea, E. I., AM El-Nouby, M., Ismail, R. I., & Taktak, N. E. (2017). Strawberry shelf life, composition, and enzymes activity in response to edible chitosan coatings. *International Journal of Fruit Science*, 17(2), 117-136.
- Benhabiles, M. S., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., & Mameri, N. (2013). Effect of shrimp chitosan coatings as affected by chitosan extraction processes on postharvest quality of strawberry. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 7, 215-221.
- Chauhan, O. P., Raju, P. S., Singh, A., & Bawa, A. S. (2011). Shellac and aloe-gel-based surface coatings for maintaining keeping quality of apple slices. *Food chemistry*, 126(3), 961-966.
- Chiabrande, V., Peano, C., & Giacalone, G. (2018). Influence of hot water treatments on postharvest physicochemical characteristics of Hayward and Jintao kiwifruit slices. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(3), e13563.
- Cofelice, M., Lopez, F., & Cuomo, F. (2019). Quality control of fresh-cut apples after coating application. *Foods*, 8(6), 189.
- De Corato, U. (2019). Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–36.
- De Leon-Zapata, M. A., Saenz-Galindo, A., Rojas-Molina, R., Rodríguez-Herrera, R., Jasso-Cantu, D., & Aguilar, C. N. (2015). Edible candelilla wax coating with fermented extract of tarbush improves the shelf life and quality of apples. *Food packaging and shelf life*, 3, 70-75.
- Demirkan, E. N., Akyürek, Ş. N., Bayraktar, D., Kutlu, G., & Törnük, F. (2024). Potential use of hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell powder in muffin production by partial substitution of wheat flour: Color, bioactive, textural, and sensory properties. *European Food Science and Engineering*, 5(1), 1-7.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- Feyzioglu, G. C., & Tornuk, F. (2016). Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications. *LWT*, 70, 104-110.
- Fozi, V., Hosseinifarahi, M., Bagheri, F., & Amiri, A. (2022). Extending shelf life of mandarin fruit using pomegranate peel extract.

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

- International Journal of Horticultural Science and Technology*, 9(1), 15-24.
- Garrido Assis, O. B., & de Britto, D. (2011). Evaluation of the antifungal properties of chitosan coating on cut apples using a non-invasive image analysis technique. *Polymer International*, 60(6), 932-936.
- Gomes, A. C. A., da Costa Lima, M., de Oliveira, K. Á. R., dos Santos Lima, M., Magnani, M., Câmara, M. P. S., & de Souza, E. L. (2020). Coatings with chitosan and phenolic-rich extract from acerola (*Malpighia emarginata* DC) or jaboticaba (*Plinia jaboticaba* (Vell.) Berg) processing by-product to control rot caused by *Lasiodiplodia* spp. in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 331, 108694.
- Guroo, I., Gull, A., Wani, S. M., Wani, S. A., Al-Huqail, A. A., & Alhaji, J. H. (2021). Influence of different types of polysaccharide-based coatings on the storage stability of fresh-cut kiwi fruit: Assessing the physicochemical, antioxidant and phytochemical properties. *Foods*, 10(11), 2806.
- Han, C., Lederer, C., McDaniel, M., & Zhao, Y. (2006). Sensory Evaluation of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa*) Coated with Chitosan-based Edible Coatings. *Journal of Food Science*, 70(3), S172–S178.
- Howard, L. R., & Griffin, L. E. (1993). Lignin Formation and Surface Discoloration of Minimally Processed Carrot Sticks. *Journal of Food Science*, 58(5), 1065–1067.
- Huang, Z., Li, J., Zhang, J., Gao, Y., & Hui, G. (2017). Physicochemical properties enhancement of Chinese kiwi fruit (*Actinidia chinensis* Planch) via chitosan coating enriched with salicylic acid treatment. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 184-191.
- Jodhani, K. A., & Nataraj, M. (2021). Synergistic effect of Aloe gel (*Aloe vera* L.) and Lemon (*Citrus Limon* L.) peel extract edible coating on shelf life and quality of banana (*Musa* spp.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 2318-2328.
- Kaya, M., Česonienė, L., Daubaras, R., Leskauskaitė, D., & Zabulionė, D. (2016). Chitosan coating of red kiwifruit (*Actinidia melanandra*) for extending of the shelf life. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 355-360.
- Kumar, N., Petkoska, A. T., AL-Hilifi, S. A., & Fawole, O. A. (2021). Effect of chitosan–pullulan composite edible coating functionalized with pomegranate peel extract on the shelf life of mango (*Mangifera indica*). *Coatings*, 11(7), 764.
- Kutlu, G. (2021). *Ruşeym yağının nanoenkapsülasyonu ve gıdalarda kullanım olanaklarının artırılması* (Doctoral dissertation).
- Kutlu, G., Yılmaz, S. & Karabulut, E. A. (2024). Development of a new vegan muffin formulation: Assessing its quality and sensory characteristics. *European Food Science and Engineering*, 5 (1), 26-34.
- Kyriakidou, A., Makris, D. P., Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., & Mourtzinou, I. (2021). Physical properties of chitosan films containing

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

- pomegranate peel extracts obtained by deep eutectic solvents. *Foods*, 10(6), 1262
- Lee, J. Y., Park, H. J., Lee, C. Y., & Choi, W. Y. (2003). Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT-Food Science and Technology*, 36(3), 323-329.
- Lin, B., Du, Y., Liang, X., Wang, X., Wang, X., & Yang, J. (2011). Effect of chitosan coating on respiratory behavior and quality of stored litchi under ambient temperature. *Journal of Food Engineering*, 102(1), 94-99.
- Liu, X., Ren, J., Zhu, Y., Han, W., Xuan, H., & Ge, L. (2016). The preservation effect of ascorbic acid and calcium chloride modified chitosan coating on fresh-cut apples at room temperature. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 502, 102-106.
- Mannozi, C., Cecchini, J. P., Tylewicz, U., Siroli, L., Patrignani, F., Lanciotti, R., Racculi, P., Dalla Rosa, M. & Romani, S. (2017). Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 440-444.
- Mannozi, C., Tylewicz, U., Chinnici, F., Siroli, L., Rocculi, P., Dalla Rosa, M., & Romani, S. (2018). Effects of chitosan based coatings enriched with procyanidin by-product on quality of fresh blueberries during storage. *Food Chemistry*, 251, 18-24.
- Mannozi, C., Glicerina, V., Tylewicz, U., Castagnini, J. M., Canali, G., Dalla Rosa, M., & Romani, S. (2021). Influence of two different coating application methods on the maintenance of the nutritional quality of fresh-cut melon during storage. *Applied Sciences*, 11(18), 8510.
- Manzoor, S., Gull, A., Wani, S. M., Ganaie, T. A., Masoodi, F. A., Bashir, K., Malik A.R. & Dar, B. N. (2021). Improving the shelf life of fresh cut kiwi using nanoemulsion coatings with antioxidant and antimicrobial agents. *Food Bioscience*, 41, 101015.
- Nair, M. S., Saxena, A., & Kaur, C. (2018). Characterization and antifungal activity of pomegranate peel extract and its use in polysaccharide-based edible coatings to extend the shelf-life of capsicum (*Capsicum annum* L.). *Food and bioprocess technology*, 11, 1317-1327.
- Nicosia, M. G. L. D., Pangallo, S., Raphael, G., Romeo, F. V., Strano, M. C., Rapisarda, P., Droby, S., & Schena, L. (2016). Control of postharvest fungal rots on citrus fruit and sweet cherries using a pomegranate peel extract. *Postharvest Biology and Technology*, 114, 54-61.
- Park, E. Y., & Luh, B. S. (1985). Polyphenol Oxidase of Kiwifruit. *Journal of Food Science*, 50(3), 678-684.
- Qi, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., & Li, Y. (2011). Extending shelf-life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), 62-66.
- Rocha, A. M., Cano, M. P., Galeazzi, M. A., & Morais, A. M. (1998). Characterisation of 'Starking' apple polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77(4), 527-534.

Potential application of chitosan based edible coating combined with pomegranate and lemon peel phenolic extract on apple and kiwifruit slices: Physical, chemical and sensory characteristic

- Shiri, M. A., Bakhshi, D., Ghasemnezhad, M., Dadi, M., Papachatzis, A., & Kalorizou, H. (2013). Chitosan coating improves the shelf life and postharvest quality of table grape (*Vitis vinifera*) cultivar Shahroudi. *Turkish journal of agriculture and forestry*, 37(2), 148-156.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2019). Antimicrobial potential of pomegranate peel: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 959-965.
- Tayel, A. A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., & Nickisch-Hartfiel, A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 47(1), 10-14.
- Tayel, A. A., Moussa, S. H., Salem, M. F., Mazrou, K. E., & El-Tras, W. F. (2016). Control of citrus molds using bioactive coatings incorporated with fungal chitosan/plant extracts composite. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(4), 1306-1312.
- Yavuz, Z., Kutlu, G., & Tornuk, F. (2022). Incorporation of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) flour into white bread as a source of dietary fibers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(11), e17050.
- Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422.
- Xi, W., Lu, J., Qun, J., & Jiao, B. (2017). Characterization of phenolic profile and antioxidant capacity of different fruit part from lemon (*Citrus limon* Burm.) cultivars. *Journal of food science and technology*, 54, 1108-1118.



Araştırma Makalesi

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

Pelin KELEŞ ÖZTÜRK¹, Şefika YAVUZ¹, Hilmi TORUN^{1*}

ÖZ

Bu araştırma, 2021-2022 yılları güz ve bahar döneminde Akdeniz Bölgesi örtüaltı domates ve biber üretim alanlarında yaygın olarak görülen yabancı ot türlerinin ve Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV) ile enfeksiyon durumunun belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Sıralarda Akdeniz Bölgesi üretim alanının %1'i olacak şekilde toplam 88 serada, 37 farklı yabancı ot türü üzerinde TSWV ile enfeksiyon durumu araştırılmıştır. Örneklenen seralarda tesadüfi 1 m²'lik çerçeveler atılmış ve yabancı ot yoğunluğu (adet/m²) belirlenmiştir. Çerçeve içerisine düşen yabancı ot türleri örneklenmiş ve bu örneklerde TSWV varlığı RT-qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. Seralarda en yaygın türler *Amaranthus retroflexus* L., *Amaranthus viridis* L. ve *Erigeron canadensis* L. olarak belirlenmiştir. Yabancı ot örneklerinde TSWV için yapılan RT-qPCR analizi sonucunda: *Malva neglecta* Wallr., *Oxalis corniculata* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall., *Medicago polymorpha* L., *Parietaria judaica* L. ve *Erigeron canadensis* L. yabancı ot türlerinin TSWV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, domates ve biber örtüaltı yetiştiriciliği yapılan alanlarda yabancı ot popülasyonlarının TSWV'nin ürünlere taşınmasında önemli potansiyel rezervuar olduğunu göstermektedir. Ayrıca seralarda viral hastalık kontrol stratejilerinin oluşturulmasında yabancı ot mücadelesinin önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: domates lekeli solgunluk virüsü, RT-qPCR, sera, TSWV, sebze

Determination Occurrence of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Infection on Host Weed Species in Greenhouse Tomato and Pepper in the Mediterranean Region

ABSTRACT

This study was planned to assess the frequency of weed species and the infection status of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in greenhouse cultivation areas of tomatoes and peppers during the fall and spring seasons from 2021 to 2022 in the Mediterranean Region. Surveys were conducted in 88 greenhouses, evaluating 1% of the total production area in the Mediterranean Region, with 37 different weed species to investigate the occurrence of TSWV infection. 1m² frames were thrown in the sampling greenhouses to determine weed density (plants m⁻²) randomly. Weed species within the frames were sampled, and the presence of TSWV in these samples was investigated using the RT-qPCR method. *Amaranthus retroflexus* L., *Amaranthus viridis* L. and *Erigeron canadensis* L. were identified as the most prevalent species in the greenhouses. The RT-qPCR analysis for TSWV in weed samples revealed that *Malva neglecta* Wallr., *Oxalis corniculata* L., *Melilotus officinalis* (L.) Pall., *Medicago polymorpha* L., *Parietaria judaica* L., and *Erigeron canadensis* L. were identified as host weed species infected with TSWV. These findings indicate that weed populations in areas where tomatoes and peppers are grown in greenhouses serve as significant potential reservoirs for TSWV transmission to crops. Furthermore, they underscore the importance of weed control in greenhouse conditions for developing effective strategies to manage viral diseases.

Keywords: tomato spotted wilt virus, RT-qPCR, greenhouse, TSWV, vegetables

ORCID ID (Yazar sırasına göre):

0000-0002-7220-9335, 0000-0003-4574-0443, 0000-0001-6730-8809

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi:19.12.2023

Kabul Tarihi: 27.06.2024

¹Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 01321, Adana, Türkiye.

*E-posta: hilmiturun@hotmail.com

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

Giriş

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) ve biber (*Capsicum annuum* L.) ülkemiz için önemli tarım ürünleri olup, Solanaceae familyası içerisinde bulunan ve insan beslenmesinde sofralarda gerek çiğ gerekse pişirilerek tüketilen sebzelerin başında gelmektedir. Türkiye'de hemen hemen her yerde yetiştirilebilen domates ve biber üretiminin örtüaltı (sera, cam, plastik vs.) değerleri incelendiğinde 2022 verilerine göre Adana, Antalya ve Mersin illerinin toplamı ülkenin üretim alanlarının %77.74 (28206.7 ha)'lük kısmını, üretimin ise %75.79 (3947177 ton)'luk kısmını karşılamaktadır (TUIK, 2023).

Bütün kültür bitkilerinde olduğu gibi domates ve biber yetiştiriciliğinde de birçok bitki koruma zararlısı (böcek, patojen, yabancı ot vs.) sorunuyla karşılaşmaktadır. Bunların başında ise verim ve kaliteyi olumsuz etkileyen yabancı otlar gelmektedir. Yabancı otlar kültür bitkisi yetiştirilen alanlarda ısı, ışık ve besin rekabetine girerek kültür bitkilerinde gelişim geriliğine sebep olurlar. Bu nedenle domates ve biber gibi ekonomik öneme sahip olan ürünlerde de yabancı otlar girdi maliyetlerini arttırmaktadır.

Ülkemizde farklı bölgelerde domates ve biber üretim alanlarında yapılan surveylerde ve çalışmalarda *Amaranthus* spp., *Chenopodium album* L., *Convolvulus arvensis* L., *Cyperus rotundus* L., *Echinochloa* spp., *Melilotus officinalis* (L.) Desr., *Phelipanche* spp., *Polygonum aviculare* L., *Portulaca oleracea* L., *Setaria viridis* (L.) P.B., *Solanum nigrum* L., *Sorghum halepense* (L.) Pers. ve *Xanthium strumarium* L. gibi yaygın türlerin üretimde problem olduğu bildirilmiştir (Özkut, 1976; Sırma ve ark., 2001; Kitiş, 2002; Pamukoğlu, 2011; Özaslan ve Kendal, 2014; Sırrı, 2014; İbrişim ve Kitiş, 2020; Akelma ve ark., 2022). Bunun yanında domates ve biber üretiminde sorun olan türlere karşı solarizasyon, malçlama, farklı mekanik uygulamalar, allelopati, herbisit ve tuzak bitki kullanımı gibi bazı önemli olabilecek mücadele yöntemleri denenmiş, ancak bu tarz çalışmalara ek olarak farklı mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi ve üretici nezdinde de yaygınlaştırılması gerektiği ortaya çıkarılmıştır (Şenol, 1999; Kaya, 2011; Arslan ve ark., 2012; Ateş ve Uygur, 2013; Aksoy ve

ark., 2014; Arslan ve Uygur, 2014). Fakat yabancı otlarla mücadele edilmemesi durumunda ürün yetiştirilen alanlarda zararlılara ve bazı patojenlere ise konukçuluk ederler. Hatta zararlı ve tehlikeli patojenlerin gerek vektörlerle gerekse mekanik yolla ürünlere taşınmasını sağlarlar.

Dünyada bitkiler ve bitkisel ürünlerin ticaretinin artması ise viral patojen etmenlerinin ve vektörlerinin yaygınlığının artmasına neden olmuştur. Kimyasal mücadele yöntemlerinin uygulanamaması ve kontrol yöntemlerinin dayanıklı çeşit ile koruyucu önlemlere dayanması viral etmenlerle mücadeleyi zorlaştırmış, konukçu spektrumunu arttırmış ve değişen çevre koşullarında viral hastalıkların önemini arttırmıştır (Hanssen ve ark., 2010). Viral etmenler ürünlerde değişen oranlarda verim ve kalite kayıplarına neden olmaktadır (Keles Ozturk ve ark., 2019; Keles Ozturk ve ark., 2020).

Bu patojenler içerisinde Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) ise önemli bir viral patojendir. TSWV, kültür bitkilerinde en fazla ekonomik öneme sahip ilk 10 virüs içerisinde ilk sıralarda yer almaktadır (Scholthof ve ark., 2011; CABI, 2023). TSWV, *Tospovirus* cinsine ve *Bunyaviridae* familyasına ait bir virüstür. Bu virüs 1915 yılında Avustralya'da domates bitkilerinde ortaya çıkmış ve 1930'lu yıllarda Hawaii ve farklı Avrupa ülkelerinde tespit edilmiştir (Adkins, 2000; CABI, 2023). Tropikal ve subtropikal ılıman iklimlerde yaygın olan TSWV'nin dünyada tarımsal ürünlerde her yıl 1 milyar dolardan fazla bir kayba neden olduğu tahmin edilmektedir (Uhrig ve ark., 1999; Griep ve ark., 2000; CABI, 2023). TSWV'nin konukçu çevresinin oldukça geniş olması (Parrella ve ark., 2003) ve trips türleri ile kolayca taşınabilmesi (Şevik, 2008; Kormelink ve ark., 2021; CABI, 2023; EPPO, 2023) epidemide ve meydana gelen verim kayıplarında önemli rol oynamaktadır (Gopal ve Uphadhyaya, 1991; Roselló ve ark., 1996; Granval de Millan ve ark., 1998; Arli-Sokmen ve Sevik, 2013). TSWV, domates veriminde %42.1 ve pazar değerinde ise %95.5 oranında azalmaya neden olmuştur. Domates mahsulündeki TSWV enfeksiyonu, enfekte bitkilerde meyvelerin ağırlığında,

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

toplam sayısında, genişliğinde ve uzunluğunda önemli azalmalara neden olmuştur (Sevik ve Arli-Sokmen, 2012).

Türkiye’de TSWV, ilk olarak Çanakkale ilinde tütün yetiştirilen alanlarda 1979 yılında tespit edilmiştir (Azeri, 1981). Ülkemizde 1995 yılında Akdeniz Bölgesi Mersin ilinde yapılan bir çalışmada, TSWV etmeninin varlığı domates bitkisinde ilk olarak bildirilmiştir (Güldür ve ark., 1995). Türkiye’deki bazı çalışmalar incelendiğinde Antalya ili Demre ili ilçesinde 2019 yılında örtüaltı biber yetiştiriciliğinde TSWV enfeksiyonu bulunma durumu %57 olarak tespit edilmiştir (Beşkeçili ve ark., 2021). Adana ilinde açık alanda yetiştirilen biberlerde TSWV’nin varlığı araştırılmış ve alınan örneklerde bulunma oranı %10,6 oranında belirlenmiştir (Keleş Öztürk ve Baloğlu, 2020). Ayrıca Doğu Akdeniz Bölgesi’ni oluşturan Adana, Mersin, Hatay, Kahramanmaraş ve Osmaniye illerinde açıkta biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda mevcut virüslerin saptanması ve örneklerde yaygınlığının belirlenmesi amacıyla 2014 ve 2015 yıllarında survey çalışması yapılmış ve alınan biber örneklerinde TSWV oranı % 4,66 olarak belirlenmiştir (Keleş Öztürk ve Baloğlu, 2019). Bu çalışma kapsamında TSWV etmeninin iller bazında bulunma oranları ise Adana ilinde %10,6, Hatay ilinde %1,3, Kahramanmaraş ilinde %0, Mersin ilinde %9,3 ve Osmaniye ilinde %2,1 olarak belirlenmiştir. Ayrıca yabancı otlar da TSWV’nin önemli inokulum rezervuar kaynağıdır. *Amaranthus* spp., *Calendula arvensis* (Vaill.) L., *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Convolvulus arvensis* L., *Cuscuta* sp., *Datura stramonium* L., *Ecballium elaterium* L., *Erigeron canadensis* L., *Malva sylvestris* L., *Portulaca oleracea* L., *Senecio vulgaris* L., *Solanum nigrum* L., *Sonchus* spp., *Sorghum halepense* L., *Stellaria media* (L.) Vill., *Trifolium* spp. ve *Xanthium spinosum* L. gibi yaygın ve önemli bazı yabancı ot türleri TSWV’yi taşıyabilmektedir (Lavina ve ark., 1996; Jordá ve ark., 2000; Arli-Sokmen ve ark., 2005; EPPO, 2023). Dahası vektör aracı olan bazı thripsler yardımı ile yabancı otlara ve bir sonraki üretim sezonunda konukçu ürüne taşınabilmektedir (Bautista ve ark., 1995; Ochoa Martinez ve ark., 1999; Groves ve ark., 2002).

Nitekim Çukurova’da yapılan çalışmalarda ve surveylerde *Frankliniella* spp. and *Thrips* spp. türlerinin bazı yabancı otlar üzerinde görüldüğü ve bu virüsü taşıdığı bildirilmiştir (Atakan ve Uygur, 2005; Atakan ve ark., 2013).

Bu çalışma Akdeniz Bölgesi Adana, Antalya ve Mersin illeri örtüaltı domates ve biber yetiştirilen alanlarda sorun olan yabancı ot türlerinin, familyalarının, yoğunluklarının ve rastlama sıklıklarının belirlenmesi, TSWV’ye karşı konukçu durumunda bulunabilen yabancı ot türlerinin saptanması ve TSWV’nin örnekleme yapılan ürünlerde bulaşıklık durumunun ortaya çıkarılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, Akdeniz Bölgesi’nde örtüaltı domates ve biber yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı alanlarda, yetiştiriciliği sınırlayan bazen de engel olan TSWV’nin varlığı ile konukçusu olan yabancı ot türlerinin saptanması hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Örtüaltı domates ve biber üretim alanlarından survey çalışması

Çalışma Adana, Antalya ve Mersin illeri örtüaltı domates ve biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda yürütülmüştür. Bu illerde domates ve biber örtüaltı üretimin yoğun olarak yapıldığı alanlarında bulunan önemli yabancı ot türlerinde TSWV’nin varlığının araştırılması amacıyla surveyler yapılmıştır. Survey çalışmaları toplam alanın yaklaşık %1’ini temsil edecek şekilde yapılmıştır.

Surveyler 2021 ve 2022 yılları içerisinde güz ve bahar dönemi örtüaltı domates ve biber üretim alanlarında toplam 88 üretim serasında; Adana ilinde 17.50 hektar alanda 14 serada, Antalya ilinde 11.90 hektar alanda 37 serada ve Mersin ilinde 27.10 hektar alanda 37 serada yabancı ot sayımları ile yabancı otlarda TSWV için örnekleme yapılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Özellikle TSWV belirtisi gösteren domates ve biber bitkilerinin etrafındaki yabancı ot örnekleri alınmıştır. Belirti görülmemesi durumunda tesadüfi örnekleme yapılmıştır (Bora ve Karaca, 1970).

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

Yabancı ot tür ve yoğunluklarının belirlenmesi

Yabancı ot sayımları domates ve biber örtüaltı alanlarında köşegenler doğrultusunda gerçekleştirilmiş olup, alanın 5-10 m içerisinde başlanarak yapılmış ve her ayrı incelenen örtüaltı domates ile biber alanında 5 adet (kez) çerçeve atılmıştır. Böylece çerçeve içerisine giren yabancı otların rastlama sıklıkları (%) ve yoğunlukları (adet/m²) hesaplanmıştır (Odum, 1971; Uygur ve ark., 1984). Rastlama sıklığı, yabancı ot türünün survey yapılan toplam alan içerisinde yüzde kaçında karşılaşıldığını gösteren değer alınmasıyla elde edilmiştir. Yoğunluk ise atılan çerçeve (metrekaredeki) içerisine düşen toplam bitki sayılarının, toplam survey yapılan çerçeve adedine bölünmesiyle hesaplanmıştır (Odum, 1971). Çizelge 1'de yabancı otların genel kaplama alanları ile sera örnekleme sayıları verilmiştir.

Sera içerisinde popülasyona hakim olan yabancı ot türlerine ait örnekler, hem TSWV ile

bulaşıklık belirtisi gösteren domates ve biber bitkilerinin etrafından, hem de belirtisi göstermeyen yabancı ot türleri alınarak yapılmıştır. Serada virüs belirtisi gösteren domates ve biber bitkilerinin bulunduğu kısımlarda, gerek sıra üstü gerekse sıra aralarından çıkış yapan yabancı ot örnekleri toplanmıştır. Sera içerisinde en az 2 farklı noktada yabancı ot örnekleme yapılmıştır. TSWV belirtisi gösteren veya göstermeyen yabancı ot türleri belirlenerek, bu türler kaydedilmiştir. Virüs simptomu göstermeyen seralarda ise sadece 1 noktada yabancı ot yoğunluğunun yüksek olduğu herhangi bir biber veya domates bitkisinin çevresinden rastgele örnek alınmıştır. Alınan her bir yabancı ot türü ayrı ayrı kağıt poşetlere konulmuştur. Ayrıca arazi çalışması esnasında türü teşhis edilemeyen yabancı otlar laboratuvara getirilerek Flora of Turkey (Davis, 1965-1988) kitabı yardımıyla teşhis edilmiştir. Daha sonra TSWV için testlenmek üzere viroloji laboratuvarına getirilmiştir.



Şekil 1. Örnekleme noktalarının haritası

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

Çizelge 1. Survey yapılan sera alanları ve alınan örnek sayıları.

İller	Örtüaltı		Toplam			
	Domates (ha)	Örnekleme sayısı	Biber (ha)	Örnekleme sayısı	Örtüaltı (ha)	Örnekleme sayısı
Adana	16.50	12	1.00	2	17.50	14
Antalya	9.90	27	2.00	10	11.90	37
Mersin	16.65	22	10.45	15	27.10	37
Total	43.05	61	13.45	27	56.50	88

Örnekleme yapılan yabancı ot türlerinde TSWV'nin tespiti

Nükleik asit izolasyonu: Örtüaltı domates ve biber yetiştirilen alanlardan toplanan yabancı ot örneklerinin yaprakları kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonunda Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (NORGEN BIOTEK CORP.) kullanılmıştır. Kit protokolüne uyularak RNA izolasyonu yapılmıştır. Örneklerin RNA miktarları Maestrogen NanoDrop spektrofotometre ile kontrol edilmiştir. Elde edilen total RNA örnekleri -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Real Time - Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR): Yabancı ot örneklerinden TSWV'nin tespiti için TSWV nükleoprotein geninin korunmuş bölgeleri içinde tasarlanmış TSWV oligonükleotid primerleri ve probu (TSWV-CP-17F 5'-CTC TTG ATG ATG CAA AGT CTG TGA-3'; TSWV-CP-100R 5'-TCT CAA AGC

TAT CAA CTG AAG CAA TAA-3' TSWV-CP-73T 5'-AGG TAA GCT ACC TCC CAG CAT TAT GGC AAG-3) kullanılmıştır (Boonham ve ark., 2001; OEPP/EPPO Bulletin, 2004).

Analizde RealTime ready RNA Virus Master Mix (Roche Life Science) kullanılmıştır. Real Time RT-PCR Master mix protokolü doğrultusunda her bir reaksiyon için: 8,6 µl su (PCR grade water), 4 µl Reaction buffer 5x conc., 0,4 µl Enzyme blend 50x conc., 0,8 µl (10 µM) Primer Fw, 0,8 µl (10 µM) Primer Rv ve 0,4 µl (10 µM) Probe eklenerek hacim 15 µl'ye ayarlanmış ve 5 µl RNA eklenerek toplam 20 µl hacimde çalışılmıştır.

Hazırlanan reaksiyon karışımı Roche Light Cycler cihazına yerleştirilerek Çizelge 2'de belirtilen RT-qPCR programı kullanılmıştır. Cq değeri 40'ın altında olan yabancı ot örnekleri TSWV ile enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Boonham et al., 2001; OEPP/EPPO Bulletin, 2004).

Çizelge 2. RT-qPCR çalışmalarında kullanılacak olan termal döngüler

Program adı	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre	Acquisition mode	Ramp rate (°C/s)
Reverse Transcription	1	50	8 dk	NONE	4.4
Initial Denaturation	1	95	30 sn	NONE	4.4
Amplification	45	95	1 sn	NONE	4.4
		60	20 sn	NONE	2.2
		72	1 sn	Single	4.4
Cooling	1	40	30 sn	-	4.4

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

Bulgular ve Tartışma

Örnekleme yapılan seralarda yabancı ot yaygınlık ve yoğunluğunun belirlenmesi

Akdeniz Bölgesi Adana (%1.00), Antalya (%11.24) ve Mersin (%6.19) domates ve biber sera alanlarında bulunan yabancı otların populasyon yoğunluklarının saptanması amacıyla toplam 88 serada survey yapılmış ve yabancı ot genel kaplama alanlarının ortalaması %7.49 olarak belirlenmiştir. Survey sonucunda 15 farklı familyaya ait 37 yabancı ot türü tespit edilmiştir. Bu yabancı ot türlerinden 4 adedi monokotiledon, 32 adedi dikotiledon ve 1 adedi parazit bitki olarak kaydedilmiştir. Saptanan yabancı ot türleri rastlanma sıklığı açısından değerlendirildiğinde ilk sırayı 23.86% rastlama sıklığı ile *Amaranthus viridis* L. ve *Erigeron canadensis* L. alırken, bunu 20.45% oranıyla *Amaranthus retroflexus* L., 10.23% oranıyla *Medicago polymorpha* L., 7.95% oranıyla *Cyperus rotundus* L., *Trifolium repens* L., *Portulaca oleracea* L. ve *Solanum nigrum* L. türleri izlemiştir. Diğer yabancı ot türlerinin ise

rastlanma sıklığı 7%'nin altında kalmıştır (Çizelge 3). Tokat ili domates üretim alanlarında Sırma ve ark. (2001) 98 tarlada 78.6 hektar alanda 25 familyaya ait 49 tür belirlemiş, bunlardan *Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L., *Convolvulus arvensis* L., *Cyperus rotundus* L. ve *Echinochloa crus-galli* (L.) P.B. türlerini önemli olarak saptamıştır. Benzer şekilde Kumluca (Antalya) ilçesinde İbrişim ve Kitiş (2020) 14.8 hektar alanda 65 domates serasında gerek rastlama sıklığı gerekse yoğunluk bakımından en önemli türleri *Amaranthus retroflexus* L., *Cyperus rotundus* L., *Melilotus officinalis* (L.) Desr. ve *Portulaca oleracea* L. olarak belirlemiş ve yapılan çalışmalarla tespit edilen bazı yabancı ot türlerinin örtüştüğü görülmüştür. Ege Bölgesi'nde İzmir ve çevresinde yapılan başka bir çalışmada, domates ve biber üretim alanlarında yabancı ot surveylerinde en yoğun türlerin *Amaranthus* spp., *Chenopodium album* L. ve *Portulaca oleracea* L. olduğu bildirilmiştir (Özkut, 1976).

Çizelge 3. Domates ve biber seralarında saptanan yabancı ot türleri, rastlanma sıklıkları (%) ve yoğunlukları (adet/m²)

Familya	Yabancı ot türü	EPP0 kodu	Yaşam döngüsü*	Rastlama Sıklığı (%)	Yoğunluk (adet/m ²)	Kaplama alanı (%)
Amaranthaceae	<i>Amaranthus blitum</i> L.	AMALI	A	1.14	<0.01	0.01
	<i>Amaranthus deflexus</i> L.	AMADE	A, P	1.14	0.01	0.02
	<i>Amaranthus graecizans</i> L.	AMAGR	A	1.14	<0.01	<0.01
	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	AMARE	A	20.45	0.45	1.25
	<i>Amaranthus viridis</i> L.	AMAVI	A	23.86	0.15	0.61
Asteraceae	<i>Erigeron bonariensis</i> L.	ERIBO	A, P	3.41	0.02	0.06
	<i>Erigeron canadensis</i> L.	ERICA	A	23.86	0.13	0.43
	<i>Lactuca serriola</i> L.	LACSE	A, B	1.14	<0.01	0.03
	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	SONOL	A	1.14	<0.01	0.01
Boraginaceae	<i>Heliotropium europaeum</i> L.	HEOEU	A	1.14	<0.01	<0.01
Caryophyllaceae	<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.	STEME	A	2.27	0.01	0.03
Convolvulaceae	<i>Convolvulus arvensis</i> L.	CONAR	P	2.27	0.01	0.02
Cyperaceae	<i>Cyperus rotundus</i> L.	CYPRO	P	7.95	0.10	0.12
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia nutans</i> Lag.	EPHNU	A	1.14	<0.01	<0.01
Fabaceae	<i>Medicago lupulina</i> L.	MEDLU	A, P	1.14	<0.01	0.03
	<i>Medicago polymorpha</i> L.	MEDPO	A	10.23	0.12	0.56
	<i>Melilotus officinalis</i> (L.) Pall.	MEUOF	A, P	3.41	0.03	0.16
	<i>Prosopis farcta</i> (Banks & Sol.) J.F.Macbr.	PRCST	P	1.14	<0.01	<0.01
	<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	TRFAL	P	1.14	<0.01	0.01
	<i>Trifolium pratense</i> L.	TRFPR	P	2.27	0.02	0.08
	<i>Trifolium repens</i> L.	TRFRE	P	7.95	0.04	0.20
	<i>Trifolium resupinatum</i> L.	TRFRS	P	3.41	0.02	0.07
	<i>Trifolium</i> spp.	TRFSS	P	4.55	0.02	0.01
	<i>Vicia sativa</i> L.	VICSA	A	6.82	0.04	0.18

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

Çizelge 3'ün devamı.

Familiya	Yabancı ot türü	EPPO kodu	Yaşam döngüsü*	Rastlama sıklığı (%)	Yoğunluk (adet/m ²)	Kaplama alanı (%)
Malvaceae	<i>Malva neglecta</i> Wallr.	MALNE	A	1.14	<0.01	0.02
	<i>Malva parviflora</i> L.	MALPA	A, P	3.41	0.01	0.02
	<i>Malva sylvestris</i> L.	MALSI	B	1.14	<0.01	0.02
Orobanchaceae	<i>Phelipanche ramosa</i> (L.) Pomel	ORARA	A, P	4.55	0.08	0.22
Oxalidaceae	<i>Oxalis corniculata</i> L.	OXACO	A, P	4.55	0.03	0.07
Poaceae	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	DIGSA	A	5.68	0.05	0.42
	<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link	ECHCO	A	4.55	0.07	0.11
	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	ELEIN	A	2.27	0.03	0.04
	<i>Setaria viridis</i> (L.) P.Beauv.	SETVI	A	1.14	0.01	0.02
Portulacaceae	<i>Portulaca oleracea</i> L.	POROL	A	7.95	0.08	0.25
Solanaceae	<i>Solanum nigrum</i> L.	SOLNI	A, P	7.95	0.05	0.37
Urticaceae	<i>Parietaria judaica</i> L.	PAIDI	P	1.14	<0.01	0.02
	<i>Urtica urens</i> L.	URTUR	A	3.41	0.01	0.01

(*) A: Tek yıllık, B: İki yıllık, P: Çok yıllık. EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization

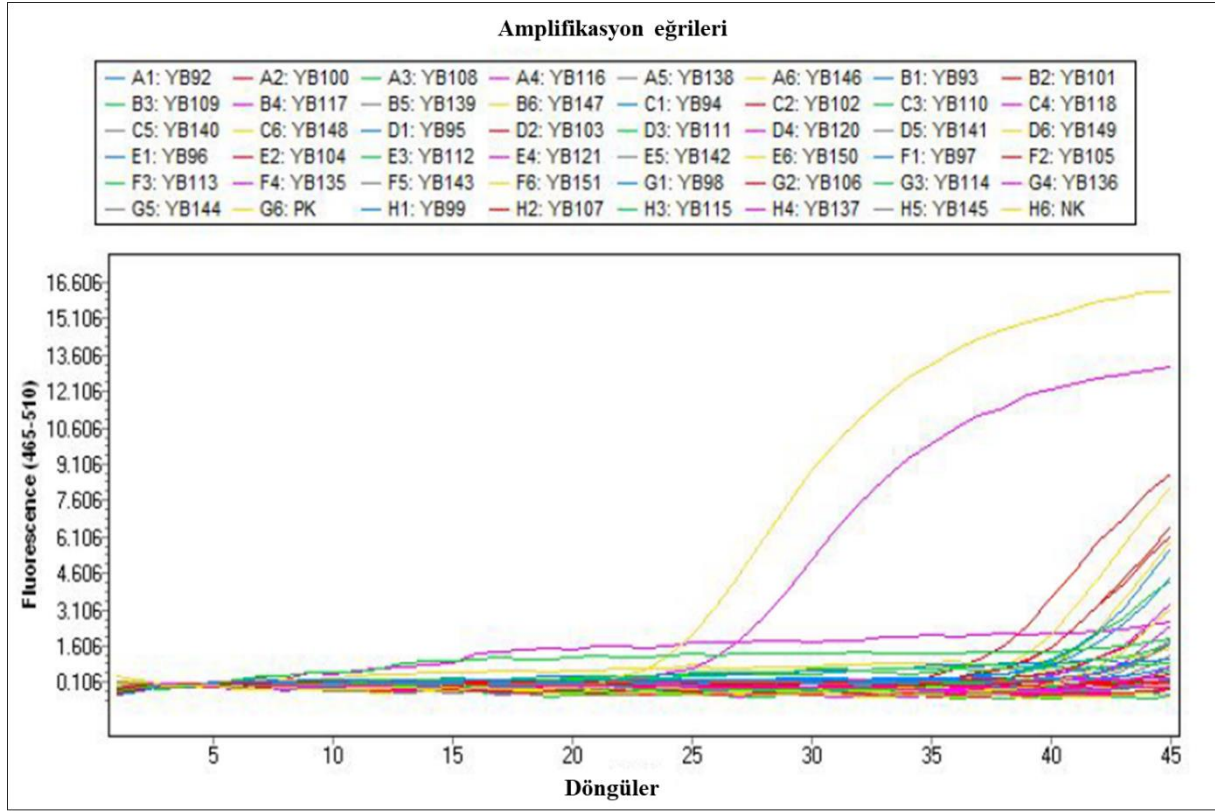
Çalışma kapsamında yapılan surveyde, seralarda tespit edilen yabancı otlar yoğunluklarına göre değerlendirildiğinde 0.45 adet/m² yoğunluk ile *Amaranthus retroflexus* L. ilk sırada yer almaktadır. Yoğunluk bakımından bu yabancı otu sırasıyla *Amaranthus viridis* L. (0.15 adet/m²) ve *Erigeron canadensis* L. (0.13 adet/m²) izlemiştir. Tür kaplama alanı bakımından *Amaranthus retroflexus* L. 1.25%'lik oranla ilk sırada yer almış, onu 0.61% ile *Amaranthus viridis* L. ve 0.56% ile *Medicago polymorpha* L. takip etmiştir (Çizelge 3). Akdeniz Bölgesi surveylerinde olduğu gibi Antalya Kumluca ilçesi domates seralarında *Amaranthus retroflexus* L. 5.70 adet/m², *Melilotus officinalis* (L.) Desr. 4.40 adet/m² ve *Portulaca oleracea* L. 3.50 adet/m² (İbrişim ve Kitiş, 2020), Diyarbakır Lice'de *Amaranthus retroflexus* L. 4.63 adet/m², *Convolvulus arvensis* L. 4.09 adet/m², *Sorghum halepense* (L.) Pers. 4.06 adet/m², *Solanum nigrum* L. 3.37 adet/m², *Echinochloa colonum* (L.) Link. 3.04 adet/m² ve parazitik yabancı otlardan *Phelipanche ramosa* (L.) Pomel 3.73 adet/m² (Özaslan ve Kendal, 2014) ile fazla yoğunluk oluşturan bazı türler benzerlik göstermiştir.

TSWV'nin yabancı ot örneklerinde bulunma durumu

Akdeniz Bölgesi'nde örtüaltı domates ve biber yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı Antalya, Mersin ve Adana illerine ait alanlarda 2021 ve 2022 yıllarında yapılan survey çalışmalarında toplanan yabancı ot örnekleri TSWV yönünden incelenmiştir. Çalışma kapsamında, Çizelge 3'de belirtilen 15 farklı familyadan 37 yabancı ot türünü içeren toplam 191 adet örnek incelenmiştir. Bu yabancı ot örneklerinde TSWV'nin varlığı RT-qPCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Antalya ili Kumluca ilçesi örtüaltı domates üretim alanının iç kısmından alınan *Malva neglecta* Wallr. ve *Oxalis corniculata* L. yabancı ot türleri Antalya Demre ilçesi domates serasının içinden alınan *Melilotus officinalis* (L.) Pall., Antalya ili Serik ilçesi domates serası içinden alınan *Medicago polymorpha* L. ile Antalya ili Aksu ilçesi örtüaltı domates üretim alanının iç kısmından alınan *Oxalis corniculata* L., *Parietaria judaica* L. ve *Erigeron canadensis* L. yabancı ot türleri TSWV ile enfekteli bulunmuştur (Şekil 2).

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi



Şekil 2. RT-qPCR analizi sonucunda TSWV ile enfekteli olduğu belirlenen yabancı ot örnekleri: YB102: *Melilotus officinalis* (L.) Pall., YB114: *Malva neglecta* Wallr., YB118: *Oxalis corniculata* L., YB148: *Medicago polymorpha* L., YB157: *Oxalis corniculata* L., YB165: *Parietaria judaica* L., YB172: *Erigeron canadensis* L.

Samsun ilinde açıkta yetiştirilen biber üretim alanlarında yapılan bir çalışmada, 24 yabancı ot türünü testlemişler ve bunlardan 16 türün Cucurbit mosaic virus (CMV), Potato virus Y (PVY), Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV) ve TSWV'den herhangi biri ile tek veya karışık enfeksiyona sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bunlardan, *Taraxacum officinale* (L.) Weber ex F.H.Wigg. (tekli enfeksiyon), *Datura stramonium* L. (CMV ve TSWV), ve *Hibiscus trionum* L. (PVY ve TSWV) yabancı ot türlerini TSWV ile enfekteli bulmuşlardır (Arli-Sokmen ve ark., 2005). İspanya'da yapılan bir çalışmada da *Calendula arvensis* (Vaill.) L., *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Convolvulus arvensis* L., *Diploaxis erucoides* (L.) DC., *Erigeron canadensis* L., *Malva sylvestris* L., *Trifolium* sp. ve *Rumex* sp. yabancı ot türlerinin TSWV ile enfekteli olduğunu belirlemiş (Lavigne ve ark., 1996) ve yapılan

çalışmayla benzer türlerin enfekteli olabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Sonuç

Bu çalışma kapsamında, Akdeniz Bölgesi'nde Adana, Antalya ve Mersin illeri örtüaltı domates ve biber üretim alanlarının iç ve dış bölümlerinden yabancı ot örnekleri alınmıştır. Örnek alınırken öncelikle mozaik, beneklenme, bodurluk, damar bantlaşması, deformasyon gibi virüs belirtisi gösteren yabancı ot türlerinden örnekler alınmıştır. Ancak yabancı otların virüs rezervuarı olması ve genellikle latent durumda bulunması nedeni ile belirti göstermeyen türlerden de örnekler alınmıştır (Powell ve ark., 1984; Khan ve ark., 1991). Toplanan yabancı ot örneklerinde TSWV'nin varlığı RT-qPCR yöntemi ile incelenmiştir. Yapılan analizlerin sonucunda toplanan örneklerden, *Malva neglecta* Wallr., *Oxalis corniculata* L., *Melilotus*

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

officinalis (L.) Pall., *Medicago polymorpha* L., *Parietaria judaica* L. ve *Erigeron canadensis* L. yabancı ot türleri TSWV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Domates ve biber yetiştiriciliğini sınırlayan ve kimyasal mücadelesi olmayan TSWV, *Thrips tabaci* Lindeman, 1889 ve *Frankliniella occidentalis* Pergande, 1895 vektörleriyle kalıcı bir şekilde taşınmaktadır. Yabancı otlar, sadece virüs rezervuarı olması nedeniyle değil, aynı zamanda TSWV taşıyan vektör thripslere ev sahipliği yapması nedeniyle de önemlidir. Ayrıca birçok yabancı ot türü yaygın viral etmenlerin konukçusu durumunda olabilmekte ve ürünlerde ciddi verim kayıplarına sebep olmaktadır (Lavina ve ark., 1996; Groves ve ark., 2002; Atakan ve ark., 2013; CABI, 2023; EPPO, 2023). Bu nedenle TSWV ile mücadelede, öncelikle dayanıklı/tolerat çeşitler tercih edilmelidir. Ayrıca kültürel önlemlere dikkat ederek, yetiştiricilik yapılan seralarda TSWV vektörü böceklerle ve virüs rezervuarı yabancı otlar ile entegre mücadele yapılmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen TAGEM/BSAD/Ü/21/A2/P1/2564 numaralı projenin çalışmalarından ayrı bir çalışma olarak yürütülmüştür.

Kaynaklar

Adkins, S. (2000). Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. *Molecular Plant Pathology* 1(3): 151-157.

Akelma, Z., Gürbüz, R., Alptekin, H. (2022). Determination of weed problems in tomato production areas of Iğdır province in Türkiye. *Turkish Journal of Weed Science* 25(2): 111-121.

Aksoy, E., Arslan, Z. F., Tetik, Ö., Eymirli, S. (2014). Domates tarlalarında sorun olan mısırlı canavar otunun [*Phelipanche aegyptiaca* (Pers.) Pomel] mücadelesinde bazı tuzak ve yakalayıcı bitkilerin allelopatik özelliklerinden yararlanma olanakları. *Journal of Agricultural Sciences* 20(2): 126-135.

Arli-Sokmen, M., Sevik, M. A. (2013). Spread of tomato spotted wilt virus from an internal virus source by thrips species in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica* 41: 159-168.

Arli-Sokmen, M., Mennan, H., Sevik, M. A., Ecevit, O. (2005). Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica* 33(4): 347-358.

Arslan, Z. F., Aksoy, E., Uygur, F. N. (2012). Doğu Akdeniz bölgesi örtüaltı domates yetiştiriciliğinde solarizasyon uygulamasının yabancı otlara ve verime etkisi. *Bitki Koruma Bülteni* 52(4): 349-366.

Arslan, Z. F., Uygur, F. N. (2014). Sebze üretiminde sorun olan yabancı otlara karşı bazı yeni ve etkili yöntemler: malç tekstili, fırçalama aleti ve keser çapa. *Bitki Koruma Bülteni* 54(3): 219-232.

Atakan, E., Kamberoğlu, M. A., Uygur, S. (2013). Role of weed hosts and the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, in epidemiology of Tomato spotted wilt virus in the Çukurova region of Turkey. *Phytoparasitica* 41: 577-590.

Atakan, E., Uygur, S. (2005). Winter and spring abundance of *Frankliniella* spp. and *Thrips tabaci* Lindeman (Thysan., Thripidae) on weed host plants in Turkey. *Journal of Applied Entomology* 129(1): 17-26.

Ateş, S., Uygur, F. N. (2013). Ekolojik yöntemlerle yetiştirilen patlıcan ve biberde yabancı ot mücadele yöntemlerinin ve etkinliklerinin araştırılması. *Nevşehir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2(1): 69-77.

Azeri, T. (1981). Preliminary report of tomato spotted wilt virus (TSWV) and its epidemy on tobacco in the Çanakkale Region of Turkey. *The Journal of Turkish Phytopathology* 10(2-3): 79-87.

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

- Bautista, R. C., Mau, R. F. L., Cho, J. J., Custer D. M. (1995). Potential of tomato spotted wilt tospovirus plant hosts in Hawaii as virus reservoirs for transmission by *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Phytopathology* 85(9): 953-958.
- Beşkeçili, M., Güneş, N., Gümüş, M. (2021). Antalya ili Demre ilçesi biber yetiştiriciliğinde tomato spotted wilt virus (TSWV) ve cucumber mosaic virus (CMV) etmenlerinin yaygınlığının belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 58(3): 399-405.
- Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Bennison, J., Barker, I. (2001). The detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real-time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* 101: 37-48.
- Bora, T., Karaca, İ. (1970). Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Ders Kitabı, İzmir, Türkiye.
- CABI (2023). Tomato spotted wilt orthotospovirus (tomato spotted wilt). <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompndium.54086> (Erişim tarihi: 23.10.2023).
- Davis, P. H. (1965-1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*.: Edinburgh University Press, Edinburgh, Great Britain.
- EPPO (2023) Tomato spotted wilt virus. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int/taxon/TSWV00> (Erişim tarihi: 25.10.2023).
- Gopal, K., Upadhyaya, H. D. (1991). Effect of bud necrosis disease on the yield of groundnut under field condition. *Indian Phytopathology* 44(2): 221-223.
- Granval de Millan, N., Piccolo, R., Gracia, O. (1998). Potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber transmission of tospoviruses (TSWV, GRSV and TCSV) in Mendoza, Argentina: *Recent Progress in Tospovirus and Thrips Research*. D. Peters, R. Goldbach (Eds.), 46-47. Department of Virology, WAU, Wageningen, Netherlands.
- Griep, R. A., Prins, M., van Twisk, C., Keller, H. J. H. G., Kerschbaumer, R. J., Kormelink, R., Golbach, R. W., Schots, A. (2000). Application of phage display in selecting tomato spotted wilt virus-specific single-chain antibodies (scFvs) for sensitive diagnosis in ELISA. *Phytopathology* 90: 183-190.
- Groves, R. L., Walgenbach, J. F., Moyer, J. W., Kennedy, G. G. (2002). The role of weed hosts and tobacco thrips, *Frankliniella fusca*, in the epidemiology of tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 86(6): 573-582.
- Güldür, M. E., Marchouks, M. G. M., Yurtmen, E., Yılmaz, M. A. (1995). Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs Tomato Spotted Wilt Virus. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 26-29 Eylül, Adana.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., Thomma, B. P. H. J. (2010). Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 539-548.
- İbrişim, H., Kitiş, Y. E. (2020). Kumluca (Antalya-Türkiye) ilçesi örtü altı domates yetiştiriciliğinde görülen yabancı otların bazı parametrelere bağlı yaygınlık ve yoğunlukları. *Turkish Journal of Weed Science* 23(1): 63-73.
- Jordá, C., Font, I., Lázaro, A., Juarez, M., Ortega, A., Lacasa, A. (2000). New natural hosts of tomato spotted wilt virus. *Plant Disease* 84(4): 489.
- Kaya, Y. (2011). Yeşil gübreleme ve malçlamanın sırik domates bitkisinde

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

- yabancı otlanmaya ve verime etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Keles Ozturk, P., Argun, D., Baloglu, S., Keles, D. (2019). Effects of tobacco etch virus (TEV) on the yield and quality of Karaisali pepper populations. *Journal of Agricultural Sciences* 25: 247-257.
- Keles Ozturk, P., Argun, D., Baloglu, S., Keles, D. (2020). Effect of Tobacco etch virus (TEV) on yield and quality of red pepper in Turkey. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus* 19(6): 101-111.
- Keleş Öztürk, P., Baloğlu, S., (2020). The determination of virus diseases for pepper grown into open fields in Adana. *Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi* 39(7): 69-78.
- Khan, M. A., Hibino, H., Aguiro, V. M., Daquiao, R. D., Opina, O. S. (1991). Rice and weed hosts of tungro-associated viruses and leafhopper vectors. *Plant Disease* 75: 926-930.
- Kitiş, Y. E. (2002). Isparta ili domates ekiliş alanlarındaki yabancı otların, rastlama sıklıklarının ve yoğunluklarının belirlenmesi ve plastik toprak örtülerinin yabancı ot kontrolü ve domates verimine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Kormelink, R., Verchot, J., Tao, X., Desbiez, C. (2021). The bunyavirales: The plant-infecting counterparts. *Viruses* 13(5): 842.
- Lavina, A., Aramburu, J., Moriones, E. (1996). Occurrence of tomato spotted wilt and cucumber mosaic viruses in field-grown tomato crops and associated weeds in northeastern Spain. *Plant Pathology* 45(5): 837-842.
- Ochoa Martinez, D. L., Zavaleta-Mejfa, E., Mora-Aguilera, G., Johansen, N. R. M. (1999). Implications of weed composition and thrips species for the epidemiology of tomato spotted wilt in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora*). *Plant Pathology* 48(6): 707-717.
- Odum, E. P. (1971). *Fundamentals of Ecology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.
- OEPP/EPPO Bulletin (2004). PM 7/34 (1) Tomato spotted wilt tospovirus. *OEPP/EPPO Bulletin* 34: 271-280.
- Özaslan, C., Kendal, E. (2014). Lice domatesi üretim alanlarındaki yabancı otların belirlenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 4(3): 29-34.
- Özkut, A. (1976). İzmir ve çevresi önemli sebze (domates, biber, patlıcan) alanlarında görülen yabancı ot türleri, bulunuş oranları ve savaş yöntemleri üzerinde araştırmalar. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Pamukoğlu, Z. (2011). Kahramanmaraş kırmızı biber alanlarında sorun olan yabancı otlar ve bunlarla mücadelede kritik periyodun belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Parrella, G., Gognalons, P., Gebre-Selassie, K., Vovlas, C., Marchoux, G. (2003). An update of the host range of tomato spotted wilt virus. *Journal of Plant Pathology* 85: 227-264.
- Powell, C. A., Forer, L. B., Stouffer, R. E., Commins, J. N., Gonsalves, D., Rosenberger, D. A., Hoffman, J., Lister, R. M. (1984). Orchard weeds as hosts of tomato ringspot and tobacco ringspot viruses. *Plant Disease* 68: 242-244.
- Roselló, S., Dfez, M. J., Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The tomato

Akdeniz Bölgesi Örtüaltı Domates ve Biber Alanlarında Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)'a Konukçu Yabancı Ot Türleri ile Enfeksiyon Durumunun Belirlenmesi

- spotted wilt virus - a review. *Scientia Horticulturae* 67(3/4): 117-150.
- Scholthof, K-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 12(9): 938-954.
- Şenol, M. (1999). Tokat (Kazova)'da yetiştirilen domates (*Lycopersicon esculentum*) kültüründe sorun olan yabancı otlar ile uygulanan farklı savaş yöntemlerinin verime olan etkileri üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Şevik, M. A. (2008). Thrips (Thripidae: Thy.) türleri ile taşınan bitki virüsleri. *Derim* 25: 1-11.
- Sevik, M. A., Arli-Sokmen, M. (2012). Estimation of the effect of tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on some yield components of Tomato. *Phytoparasitica* 40: 87-93.
- Sırma, M., Kadioğlu, İ., Yanar, Y. (2001). Tokat ili domates ekim alanlarında saptanan yabancı ot türleri, yoğunlukları ve rastlanma sıklıkları. Türkiye III. Herboloji Kongresi Bildiri Özetleri, 9-12 Ekim, Ankara.
- Sırrı, M. (2014). Tokat (Kazova) ve Konya (Çumra) ovalarında arazi kullanımına bağlı olarak yabancı ot dağılımının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- TUIK (2023). Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: 23.03.2023).
- Uhrig, J. F., Soellick, T. R., Minke, C. J., Philipp, C., Kellmann, J. W., Schreier, P. H. (1999). Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of tomato spotted wilt tospovirus: Identification and characterization of two interacting domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 55-60.
- Uygur, F. N., Koch, W., Walter, H. (1984). Yabancı Ot Bilimine Giriş, PLITS 1984/2(1). Verlag J. Margraf, Stuttgart, Germany.



Araştırma Makalesi

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Ayşenur ŞİRİN¹, Ali KARANFİL¹, Savaş KORKMAZ^{1*}

ÖZ

Bağ alanlarında verim ve kaliteyi düşüren en önemli faktörlerin başında hastalık ve zararlılar gelmektedir. Bunların içerisinde mücadelenin zor olması nedeni ile virüs hastalıkları büyük bir öneme sahiptir. Bağ alanlarında gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde çok sayıda virüs hastalığı tanımlanmıştır. Bu virüs hastalıklarından bir tanesi de grapevine fanleaf virus (GFLV)'dur. GFLV ile ilgili olarak ülkemizde çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, çalışmaların büyük bir kısmı virüsün tespitine yönelik olmuştur. Bu çalışma etmenin tespiti ve izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile yürütülmüştür. Bu amaçla Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarında virüs ve virüs benzeri semptom gösteren 60 bitkiden örnekler alınarak GFLV spesifik primer çifti ile ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak testlenmiştir. Gerçekleştirilen testlemeler sonucunda toplanılan örneklerin 34'ünde GFLV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Toplanan örneklerdeki GFLV enfeksiyon oranı ise %56.66 olmuştur. Enfekteli örneklerde en dikkat çeken semptom tipi yapraklardaki sarımtırak klorozlar ve yaprak deformasyonları olarak belirlenmiştir. İzolatların moleküler karakterizasyonu amacı ile enfekteli olarak bulunan örneklerden elde edilen 4 izolat seçilerek kendi içlerinde ve dünya izolatları ile kılıf protein (CP) gen bölgesine göre göstermiş oldukları benzerlik ve filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda Türk ve dünya izolatlarının birbirleri ile %85 ve üzeri nükleotid ve amino asit benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Filogenetik analizler sonucunda ise Türk izolatlarının iki farklı gruba dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: GFLV, RT-PCR, Benzerlik, Filogenetik

Detection and Molecular Characterization of Grapevine Fanleaf Virus in Vineyards of Çanakkale Province

ABSTRACT

Diseases and pests are among the most important factors that reduce productivity and quality in vineyards. Among these, virus diseases are very important because they are difficult to combat. As a result of studies carried out in vineyard areas, many virus diseases have been identified. One of these virus diseases is grapevine fanleaf virus (GFLV). Although many studies have been conducted on GFLV in Türkiye, most studies have focused on detecting the virus. This study was carried out to identify the agent and molecular characterization of its isolates. For this purpose, samples were taken from 60 plants showing virus and virus-like symptoms in the vineyard production areas of Çanakkale province and its districts and tested using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with GFLV-specific primer pair. As a result of the tests performed, GFLV infection was detected in 34 of the samples collected. The GFLV infection rate in the collected samples was 56.66%. The most striking symptom type in infected samples was determined to be yellowish chlorosis and leaf deformations on the leaves. For molecular characterization of the isolates, 4 isolates obtained from the infected samples were selected and their similarities and phylogenetic relationships among themselves and with world isolates were investigated based on the coat protein (CP) gene region. As a result of molecular characterization studies, it was determined that Turkish and world isolates showed 85% or more sequence similarity. As a result of phylogenetic analysis, it was determined that Turkish isolates were distributed into two different groups.

Keywords: GFLV, RT-PCR, Similarity, Phylogenetic

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-2666-9007, 0000-0002-4503-6344, 0000-0001-8227-3800

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 13.01.2024

Kabul Tarihi: 27.06.2024

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

*E-posta: skorkmaz@comu.edu.tr

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Giriş

Asma vejetatif yollar ile çoğaltılan bir bitkidir ve çok fazla sayıda zararlı ve patojenler bu kültür bitkisine zarar vermektedir (Türkmen, 2020). Bu patojen ve zararlılar bağ alanlarında önemli ölçüde verimde azalmalara, ürün kayıplarına ve asmalarda ömrün kısalmasına sebep olmaktadır. Bağlarda hastalık etmenleri içinde virüs hastalıkları önemli derecede ekonomik kayba neden olan önemli bir grubu oluşturmaktadır. Çok sayıda viral etmenin ülkemiz bağ alanlarında enfeksiyonları bugüne kadar yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir. Ülkemiz ve dünyada bağ alanlarında enfeksiyona neden olan virüslerden bir tanesi de grapevine fanleaf virus (GFLV)'dür.

Asmanın en eski viral hastalığı olarak bilinen GFLV 1950'li yıllarda keşfedilmiştir. Dünyada asma yetiştiriciliğinin yapıldığı her yerde görülen ve ekonomik açıdan önemli bir virüstür. GFLV'nin konukçuları *Vitis vinifera* ve hibrit asma anaçları olarak bilinmektedir. Tüm *Vitis vinifera* çeşitleri GFLV'ye karşı duyarlı olup dayanıklı olarak bilinen tek bir çeşit bulunmamaktadır. GFLV, Secoviridae familyasından *Nepovirus* cinsine ait bir virüstür. Partikülleri 30 nm çapındadır. Segmentli bir genom yapısına sahip olan GFLV, RNA1 ve RNA2 olmak üzere iki parçalı bir genom içermektedir. Virionları +(ss)RNA yapısındadır (Demangeat ve ark., 2004).

Virüsün belirtileri iki farklı tipte görülmektedir. Bu belirtilerden ilki şekil bozukluklarıdır. Asma yapraklarının şeklinde bozulmalar, büzüşmeler ve dişlenmeler görülmektedir. Yapraktaki şekil bozukluklarının yanında nadir olarak klorotik beneklenme görülebilir. Sürgünlerde de anormal dallanmalar, çift boğum oluşumu, boğum aralarının kısalması, yassılaşımlar ve zigzag büyüme gibi deformasyonlar oluşmaktadır. Salkımlarda ise küçülme ve azalma görülmektedir. Normalden küçük tane tutumuna neden olabilmektedir. En tipik belirtilerinden biri ise yapraklarda sarı mozaik oluşumudur. Bahar mevsimi ile yapraklarda parlak sarımtırak renk değişimleri görülür. Damarlarda veya damarlar arasında büyük lekeler görülebilir. Yazın artan sıcaklıklar ile bu lekeler maskelenir.

Bu iki tip belirtinin yanında damarlarda bantlaşmalar da görülmektedir (Stellmach, 1973). GFLV üretim materyallerinden kalem, anaç, mekanik yollar ve vektörler ile taşınmaktadır. GFLV'nin vektörü Longidoridae familyasına ait kamalı nematodlar olarak adlandırılan *Xiphinema index* ve *X. italiae*'dir (Avgelis and Tzortzakakis; Tülek, 2014; Türkmen ve Ertunç, 2019).

GFLV ile ilgili ülkemizin bağ üretim alanlarında etmenin tanısına yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Kaya ve Erilmez, 2014; Tülek, 2014; Önder ve ark., 2016; Karadeniz ve ark., 2018). Ancak moleküler karakterizasyonuna yönelik son derece sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir (Türkmen, 2020). Çanakkale ilinde ise hastalığın varlığına ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinde GFLV benzeri belirti gösteren asmalardan örneklemeler yapılmıştır. Bu örnekler RT-PCR yöntemi ile gen spesifik primer çiftleri kullanılarak GFLV enfeksiyonu açısından testlenmiştir. Testlemeler sonucunda elde edilen izolat sayısına bağlı olarak 4 izolatın kılıf protein (Coat protein; CP) genine göre genetik çeşitliliğine yönelik analizler gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metot Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları Çanakkale ili ve ilçelerinde 2021-2022 yılları içerisinde bağ alanlarında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Çanakkale Merkez, Bayramiç, Eceabat, Lapseki ve Bozcaada ilçelerinde örneklemeler yapılmıştır. Bağ alanlarındaki bitkiler ilkbahar ve sonbahar aylarında yapılan arazi çalışmalarında semptomatolojik olarak incelenmiştir. Virüs ve virüs benzeri semptom gösteren bitkilerden yaprak ve/veya odun dokusu örnekleri toplanmıştır. GFLV ile enfekteli olduğu düşünülen örnekler uygun saklama koşullarında üniversitemizin viroloji laboratuvarına getirilmiştir.

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Virüs Tanılama Çalışmaları

Arazi çalışmaları sonucu toplanan örneklerdeki GFLV enfeksiyonu RT-PCR testleri ile belirlenmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak toplanan örneklerden total nükleik asit (TNA) izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonrasında RT-PCR analizleri yapılmıştır. RT-PCR testlerinde GFLV'e spesifik primer çifti kullanılmıştır. Elde edilen test sonuçları agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilerek virüs tanılama çalışmaları sonlandırılmıştır. Ayrıca virüs tanılama çalışmalarında Bioreba GFLV pozitif kontrol (Art. Nr.: 120453, İsviçre) ve negatif kontrol (Steril saf su) testlerin doğruluğu amacı ile kullanılmıştır.

Total Nükleik Asit İzolasyonu

Arazide GFLV enfeksiyonu açısından şüpheli olarak görülen ve toplanan örneklerden TNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Li ve

ark. (2008)'in belirttiği CTAB metodu ile TNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla total TNA izolasyonunda ilk olarak her bir bitki örneğinden 1 g tartılarak ayrı ayrı porselen havanlara konulup, üzere 1 mL CTAB buffer ve 20 µL DDT eklenerek Li ve ark. (2008)'in belirttiği şekilde izolasyon aşamaları yerine getirilmiştir.

RT-PCR Çalışmaları

Gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları kimyasalların sağlandığı firmaların ve GFLV'in CP gen bölgesinin kısmi dizilerine spesifik Rowhani ve ark. (1993)'in belirttiği primer çifti (Çizelge 1) ve RT-PCR koşulları da dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonlarında Takara (Japonya) firmasından sağlanan PCR mastermiks kullanılarak ve MJ Mini (Bio-Rad, ABD) PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. PCR çalışmalarında kullanılan primer çifti

Primer Yönü	Sekans (5' - 3')	Ürün büyüklüğü	Referans
İleri	ACCGGATTGACGTGGGTGAT	321 bp	Rowhani ve ark. (1993)
Geri	CCAAAGTTGGTTTCCCAAGA		

Sekans Analizleri

Agaroz jel elektroforezi sonucunda GFLV enfeksiyonu tespit edilen örnekler belirlenerek, bu izolatların moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enfekteli örnekler arasından 4 GFLV izolatı seçilerek, virüs tanılama çalışmalarında kullanılan primer çifti ve RT-PCR koşulları ile izolatların CP genleri çoğaltılmıştır. Çoğaltılan CP genlerinin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde ayrıca marker olarak "SGM04 (BioBasic, Kanada)" kullanılmıştır.

Seçilen GFLV izolatlarına ait CP genlerinin diziliminin belirlenmesi amacı ile BM Labosis firmasından (Ankara) sekanslama hizmeti alınmıştır. Sekanslama çift yönlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham sekans verileri CLC Main Workbench programında birleştirilerek ileri analizler için hazır hale getirilmiştir.

Çanakkale ili GFLV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile izolatların kendi içlerinde ve dünyadaki diğer izolatlar ile benzerlik oranları ve filogenetik ilişkilerinin

belirlenmesi amacı ile analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak gen bankası veri tabanında GFLV izolatlarının hedef CP genlerine karşılık gelen bölgeyi içeren izolatlar gen bankasından alınmıştır (Çizelge 2). Alınan bu izolatlar ile Çanakkale GFLV izolatlarına ait veriler Sequence Demarcation Tool (SDT) programında (Muhire ve ark., 2014) çoklu dizileme yapılarak izolatların nükleotit ve amino asit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları benzerlik oranları belirlenmiştir.

İzolatların filogenetik ilişkileri de CLC Main Workbench (V.20) programında belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak GFLV sekans verileri Clustal W ile dizilenmiştir. Daha sonra bu diziler neighbor-joining metodu ile 1000 tekrarlı bootstrap değeri uygulanarak GFLV izolatlarının filogenetik ilişkilerini gösteren ağaç oluşturulmuştur. Ayrıca filogenetik ağaçta ağacın doğruluğunu arttırmak amacıyla dış grup olarak olive latent ringspot virus (OLRV) kullanılmıştır.

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Çizelge 2. Biyoinformatik analizlerde kullanılan bazı grapevine fanleaf virus (GFLV) izolatlarına ait bilgiler

İzolat	Erişim Numarası	İzolat	Erişim Numarası
CAZINA1	GU972571	A17a	AY780899
CAZINA2	GU972572	3138-01	JX513895
CAZINA3	GU972573	1050-02	JX513890
CACSB1	GU972576	Vol50c2	DQ922661
CACSB2	GU972577	Vol51c2	DQ922663
CACSB4	GU972579	Vol52c1	DQ922667
CACSC1	GU972581	Vol54c2	DQ922669
CACSC2	GU972582	Vol55c1	DQ922671
F13	NC003623	Vol57c1	DQ922674
GHu	EF426852	Vol57c3	DQ922676
MEnd	JN793478	Vol57c4	DQ922677
A17d	AY780901	Vol57c5	DQ922678
A10a	AY780902	Vol57c6	DQ922679
B19a	AY780903	SDHN	KU522585

Sonuçlar ve Tartışma

Gerçekleştirilen arazi çalışmaları kapsamında Çanakkale Merkez ve Bayramiç'ten 13, Eceabat'tan 7, Lapseki'den 4 ve Bozcaada'dan 23 virüs ve virüs benzeri belirti gösteren bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Bu kapsamda toplamda 60 örnek toplanmıştır. Alınan örneklerin RT-PCR ile GFLV enfeksiyonu açısından testlenmesi sonucunda ise

34 örnekte GFLV enfeksiyonu bulunmuştur. GFLV enfeksiyonunun ilçelere göre dağılımı ise şu şekildedir: Bayramiç'te 5 bitkide, Eceabat'ta 7 bitkide, Lapseki'de 4 bitkide ve Bozcaada'dan ise 18 bitkide tespit edilmiştir. Merkez ilçede toplanan örneklerde ise GFLV enfeksiyonu tespit edilememiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarından toplanılan ve grapevine fanleaf virus (GFLV) ile enfekteli bulunan örnek sayıları ve GFLV enfeksiyon oranı

İlçeler	Enfekteli Örnek Sayısı	Toplanan Örnek Sayısı	Enfeksiyon Oranı (%)
Bayramiç	5	13	38.46
Eceabat	7	7	100.00
Lapseki	4	4	100.00
Bozcaada	18	23	78.26
Merkez	-	13	-
Toplam	34	60	56.66

Çalışma kapsamında ilçe bazında alınan örneklerde enfeksiyon oranları arasında homojen bir dağılım olmadığı görülmüştür. Eceabat ve Lapseki'den alınan tüm örnekler enfekteli çıkarken Merkez ilçeden alınan 13

örnekte enfekteli bitkiye rastlanılmamıştır. Çanakkale'de bağcılık çok eskiden beri yapılan bir üretim faaliyetidir. Ancak bağ alanları Bozcaada dışında modern bir üretim şekline sahip değildir. Çoğunlukla goble sistemi

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

şeklinde üretim yapılmaktadır ve yine Bozcaada dışında asma bitkileri oldukça yaşlıdır. Ayrıca ilçe bazında da toprak yapıları ve arazi yükseltileri de birbirinden farklıdır. Tüm bu bilgilerin ışığında çeşit özellikleri, bağlarda uygulanan kültürel işlemler, toprak ve iklim yapılarından kaynaklanan farklılıklar, asma bitkilerinin yaşı ve virüsü taşıyan nematodların toprakta bulunma durumu gibi faktörler göz önünde bulundurulduğunda her ilçeden alınan örneklerdeki enfekteli bitki sayısı farklılık göstermektedir. Çanakkale’de bağ üretimi yapılan alanlarda (Gökçeada hariç) hem ilkbahar döneminde hem de sonbahar döneminde hemen hemen tüm bağ alanlarına arazi çıkışları yapılarak bitkiler görsel olarak incelenmiştir. Çok fazla bağ alanları görsel olarak incelenmesine rağmen sadece 60 bitkiden örnek alınmıştır. Her ne kadar örnek alınan bitkiler içinde hastalıklı bitki oranı yüksek olarak görünse de (%56.66) bu toplanan örnekler içindeki hastalıklı bitki oranını ifade etmektedir. Bununla birlikte bağ alanlarında GFLV benzeri semptom gösteren bitki sayısı oldukça azdır. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada da farklı enfeksiyon oranları bildirilmiştir. Özaslan ve ark. (1995), ülkemizin Doğu Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde bağ üretimi yapılan alanlarında bağ virüslerinin varlığına yönelik yaptıkları bir çalışmada biyolojik testlemeler sonucunda 190 örneğin 89’unu (%48) GFLV ile enfekteli bulurken, Çığışar (2002), Güneydoğu Anadolu bölgesi bağ alanlarında virüs ve virüs

benzeri hastalıkların durumunu belirlemek amacıyla yürüttüğü bir çalışmada topladıkları 1001 örnekte GFLV enfeksiyon oranını %8,1 olarak bulmuştur. Bir başka çalışmada ise Karadeniz ve ark. (2018), Tokat ili ve ilçelerinde bağ üretimi yapılan alanlarda bağda virüs hastalıklarının varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları serolojik testler sonucunda GFLV enfeksiyon oranını %0.3 olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlardan da anlaşıldığı gibi GFLV enfeksiyon oranı ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan birçok çalışmada farklı oranlarda tespit edilmiştir. Tüm bu çalışmalar bizim çalışmamızda farklı ilçelerde farklı enfeksiyon oranlarının ortaya çıkmasını destekler niteliktedir.

GFLV ile enfekteli olarak bulunan örneklerdeki en tipik virüs semptomları yapraklardaki gümüş renge dönen sararmalar olarak gözlenmiştir. Ayrıca bu sararmaların bazen yaprağın tamamını kapladığı bazen de sadece yaprak kenarlarında olduğu görülmüştür (Şekil 1). Ancak sözü edilen bu belirtilere ilkbahar başlangıcında rastlanılmıştır. Sonbahar aylarında yapılan örneklemelerde çok tipik semptom oluşumu gözlenmediği durumlarda da GFLV enfeksiyonu tespit edilebilmiştir. Bu bağlamda etmenin ilkbahar aylarında oldukça karakteristik semptomlara neden olmasına rağmen, vejetasyon periyodunun sonuna doğru bitki içindeki konsantrasyonunun arttığı düşünülmektedir.

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu



Şekil 1. Grapevine fanleaf virus ile enfekteli asma bitkilerinde gözlenen sararma ve yaprak deformasyonu belirtileri

GFLV ile enfekteli olarak bulunan bitkilerde gözlenen belirtiler ülkemizde bu zamana kadar yapılan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlar ile de benzerlik göstermektedir. Kaya ve Erilmez (2014), Ege bölgesi bağ alanlarında virüs hastalıklarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında GFLV ile enfekteli bitkilerin yapraklarında sararma ve yelpaze şeklinde belirtilerin olduğunu belirtmişlerdir. Türkmen (2020), tarafından Batı Karadeniz bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışmada da GFLV ile enfekteli bitkilerin yaprak damarlarında renk açılmaları olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda bu çalışma ve belirtilen diğer çalışmalardan elde edilen GFLV belirtileri birbirleri ile oldukça paralel olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada araziden toplanan örnekler RT-PCR yöntemiyle test edilmiştir. Testlemeler süresince yöntem açısından herhangi bir zorlukla karşılaşılmağı. Enfekteli örnekler RT-PCR sonucunda agaroz jelde beklenen büyüklükte bantlar oluşturmuştur. GFLV floemde sınırlı bir virüstür. Bu nedenle dokulardaki konsantrasyonu mevsimsel olarak değişkenlik

gösterebilmektedir. Özellikle teşhis amaçlı serolojik yöntemler kullanıldığında bazen beklenen düzeyde iyi sonuçlar vermeyebilmektedir. Bu kapsamda tanı ve teşhis için moleküler bir yöntem olan RT-PCR her zaman çok daha duyarlı bir yöntem olması nedeniyle birçok araştırmacı tarafından başarıyla kullanıldığı görülmektedir (Rowhani ve ark., 1993; Pourrahim ve ark., 2007; Eichmeier ve ark., 2010; Cepin ve ark., 2021).

Nitekim Önder ve ark. (2016), ülkemiz bağlarında sorun oluşturan ve yaygın olarak bulunan GFLV'yi klasik RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR kullanarak testlemişlerdir. Çalışma kapsamında daha önceden serolojik yöntemlerle test edilmiş enfekteli bulunan ve sağlıklı örnekler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar birbiriyle kıyaslandığında her iki moleküler yönteminde GFLV'nin teşhisinde başarıyla kullanıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada GFLV'nin tanısında moleküler metotların başarı ile tanı amaçlı olarak kullanılabilceğini destekler niteliktedir.

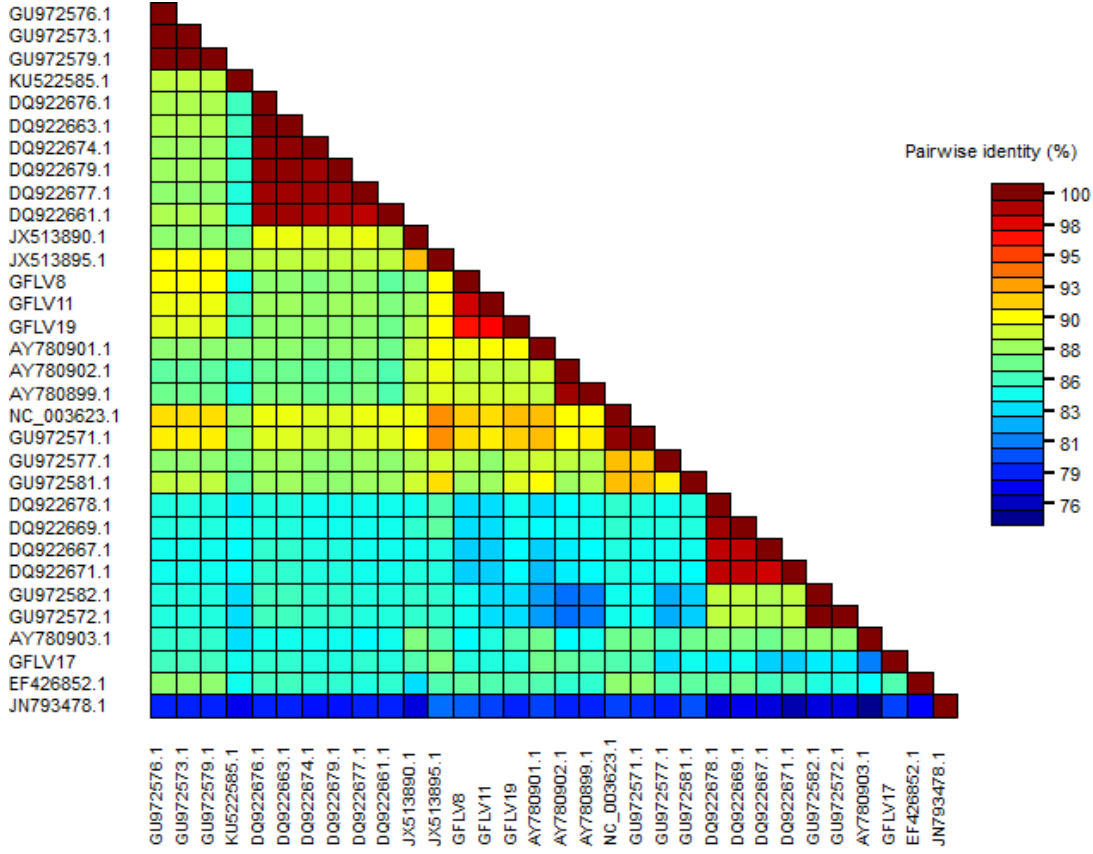
Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Çanakkale ili ve ilçelerinde tespit edilen GFLV izolatlarının moleküler karakterizasyonları amacı ile 4 GFLV izolatı seçilerek moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla GFLV enfeksiyonu tespit edilen her bir ilçeden bir izolat olacak şekilde GFLV izolatı belirlenmiştir. Bozcaada'dan GFLV-8, Bayramiç'ten GFLV-11, Eceabat'tan GFLV-17 ve Lapseki'den GFLV-19 izolatı seçilmiştir. Seçilen bu izolatların CP gen bölgesinin 321 bç'lik kısmı RT-PCR ile çoğaltılmıştır.

Çanakkale ili GFLV izolatlarının kendi içlerinde nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranlarına bakıldığında %83-98 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Çanakkale GFLV izolatlarından 8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların birbirleri ile oldukça yakın sekans benzerliğine sahip olduğu görülmüştür. Eceabat'tan elde edilen 17 numaralı izolatın ise diğer Çanakkale izolatları ile sahip olduğu sekans benzerlik oranının genel olarak %83 düzeyinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 2).

Dünya izolatları ile nükleotit düzeyinde Çanakkale GFLV izolatlarının göstermiş oldukları sekans benzerlik oranlarına bakıldığında ise izolatların %76-90 arasında bir benzerliğe sahip olduğu görülmektedir. Nükleotit düzeyindeki benzerlik matrisi detaylı olarak incelendiğinde bazı dünya izolatlarının birbirleri ile %100 sekans benzerliği gösterdiği de görülmektedir. Ancak Çanakkale GFLV izolatları ile bu oranda sekans homolojisi gösteren izolat yoktur. Çanakkale 8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların AY780901 erişim numaralı, A17d kodlu Fransa orijinli izolat ile en yüksek benzerlik oranını (%90) gösterdikleri belirlenmiştir. Eceabat izolatı olan 17 numaralı GFLV izolatının ise en yüksek sekans benzerlik oranını EF426852 erişim numaralı, GHu kodlu Macaristan izolatı ile %83 sekans benzerlik oranı ile gösterdiği görülmektedir. Genel olarak Türk izolatlarına sekans benzerliği açısından en uzak GFLV izolatının ise JN793478 erişim numaralı, MEnd kodlu Çekya izolatının olduğu belirlenmiştir. Bu izolat ile Çanakkale GFLV izolatlarının sekans benzerlik oranı %76 olarak gerçekleşmiştir (Şekil 2).

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

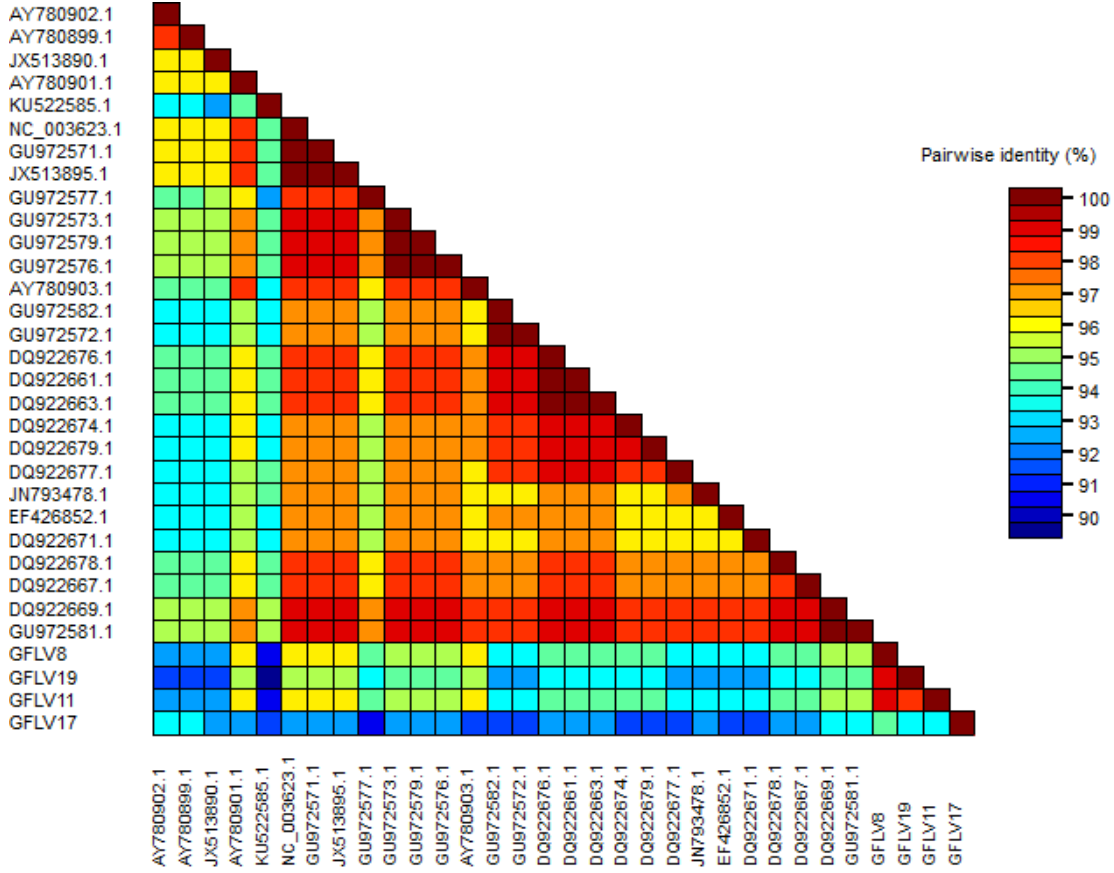


Şekil 2. Grapevine fanleaf virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesine göre nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları

Çanakkale ili GFLV izolatlarının amino asit düzeyindeki benzerlik oranları incelendiğinde izolatların kendi içlerinde %93-98 arasında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. GFLV 8,11 ve 19 numaralı sırası ile Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların birbirleri ile %98 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Eceabat'tan elde edilen 17 numaralı izolatın ise diğer Çanakkale izolatlarından sekans benzerliği açısından oldukça farklı olduğu görülmüştür. GFLV-17 numaralı Eceabat izolatının diğer izolatlar ile sekans benzerlik oranının %83 olarak bulunmuştur (Şekil 3).

Çanakkale ili GLFV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyindeki sekans benzerlik oranları karşılaştırıldığında izolatların birbirleri %90-97 oranında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Çanakkale ili izolatlarına sekans benzerlik oranı açısından en yakın izolatlar AY780901 erişim numaralı A17d kodlu, NC003623 erişim numaralı F13 kodlu ve AY780903 erişim numaralı B19a kodlu Fransa izolatları, GU972571 erişim numaralı CAZINA1 kodlu ve JX513895 erişim numaralı 3138-01 kodlu ABD izolatları %97 benzerlik oranı ile belirlenmiştir. Çanakkale ili GFLV izolatlarına en uzak olan izolat ise GU972577 erişim numarası ile CACSB2 kodlu ABD izolatı %90 benzerlik oranı ile belirlenmiştir (Şekil 3).

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu



Şekil 3. Grapevine fanleaf virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesine göre amino asit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları

Pourrahim ve ark. (2007), İran'ın kuzey doğusunda bulunan iki farklı bölgeden elde edilen beş farklı GFLV izolatını, CP gen dizilerine dayalı olarak karakterize etmişlerdir. Biyoinformatik analizler sonucunda bu izolatların genbankasında bulunan diğer GFLV izolatları ile CP gen bölgeleriyle %83.7-87.5 ve kuzeybatı İran'dan gelen diğer izolatlarla %83.0-87.1 homolojiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen GFLV izolatları kendi arasında %98.6 ile %100 arasında bir benzerlik göstermiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile Pourrahim ve ark. (2007)'nin elde ettiği sonuçlar kısmen birbirini destekler niteliktedir.

Çanakkale ili GFLV izolatları ile dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen GFLV izolatları

kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta tüm izolatların 5 farklı gruba dağılım gösterdiği görülmüştür. Çanakkale ili GFLV izolatlarının ise bu gruplardan ikisine dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Çanakkale ili izolatlarından GFLV-8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların I. grupta, 17 numaralı Eceabat'tan elde edilen izolatın ise 5. grupta yer aldığı belirlenmiştir. Çanakkale ili izolatlarından 8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatlarla en yakın olarak bulunan izolat AY780901 erişim numaralı, A17d kodlu Fransa izolatı olurken, 17 numaralı Eceabat izolatına en yakın olarak bulunan izolat ise EF426852 erişim numaralı GHu kodlu Macaristan izolatı olmuştur (Şekil 4).

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu



Şekil 4. Grapevine fanleaf virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesine göre nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları filogenetik ilişkiler

Oliver ve ark. (2010) Kaliforniya ve dünya GFLV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile yürütmüş oldukları çalışmalarında GFLV izolatlarının CP gen bölgesine göre 9 filogenetik gruba ayrıldığı belirtmişlerdir. Gerçekleştirilen bu çalışmada 5, Oliver ve ark. (2010)'nın çalışmasında ise 9 grup oluşumunun kullanılan izolat sayısı ve farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile GFLV'nin Çanakkale ilinde bağ üretimi yapılan alanlarında varlığı RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. GFLV ülkemizde ve dünyada yaygın olan ve üretimde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir virüstür. Bu nedenle Çanakkale ilinde yeni kurulacak olan bağ alanları GFLV'nin vektörleri olan nematodlar açısından kontrol edilmeli ve temiz olan alanlarda bağ tesis edilmelidir. Ayrıca tüm çok yıllık ve tek yıllık bitkilerde olduğu gibi bağ üretiminde de sağlıklı üretim materyalleri ile yeni bağlar kurulmalıdır.

Ülkemizde GFLV ile ilgili bu zamana kadar yapılan çalışmalar daha çok biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak virüsün

teşhisine yöneliktir. Bundan sonra bu çalışmalara ilaveten virüs-vektör ilişkileri, dayanıklılık çalışması vb. gibi çalışmalar da yapılarak virüsün kontrolüne yönelik yeni stratejiler geliştirilmelidir.

Teşekkür

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: FYL-2021-3747.

Kaynaklar

- Avgelis, A. D., Tzortzakakis, E. A. (1997) Occurrence and distribution of Xiphinema species and grape fanleaf nepovirus in vineyards of the Greek island of Samos. *Nematologia Mediterranea* 25: 177-182.
- Cepin, U., Gutiérrez-Aguirre, I., Balažic, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., Ravnikar, M. (2010) A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of Grapevine fanleaf virus. *Journal of Virological Methods* 170 (1-2): 47-56.

Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

- Cigsar, I., Digiario, M., Martelli, G.P. (2002). Sanitary status of grapevines in south-eastern and central Anatolia (Turkey). *EPPO Bulletin* 32 (3): 471-475.
- Demangeat, G., Komar, V., Cornuet, P., Esmenjaud, D., Fuchs, M. (2004). Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single *Xiphinema* index nematode vector. *Journal of Virological Methods* 122 (1): 79-86.
- Eichmeier, A., Baránek, M., Pidra, M. (2010). Analysis of genetic diversity and phylogeny of partial coat protein domain in Czech and Italian GFLV isolates. *Plant Protection Science*, 46 (4): 145-148.
- Karadeniz, H., Yağcı, A., Topkaya, Ş., Yanar, Y. (2018) Tokat ili ve ilçelerinde bazı bağ virüs hastalıklarının serolojik yöntemlerle belirlenmesi, *Bitki Koruma Bülteni* 58 (2): 103-110.
- Kaya, A., Erilmez, S. (2014) Detection of viruses in Aegean Region grapevines. *The Journal of Turkish Phytopathology* 43 (1-2-3): 45-57.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J., Kinard, G. (2008) A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the pcr-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154 (1-2): 48-55.
- Muhire, B.M., Varsani, A., Martin, D.P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One*, 9: 0108277.
- Oliver, J. E., Vigne, E., Fuchs, M. (2010) Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. *Virus Research* 152 (1-2): 30-40.
- Önder, S., Paylan, İ.C., Gümüş, M. (2016) Comparison of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR assays for diagnosis of grapevine fanleaf nepovirus (GFLV), *The Journal of Turkish Phytopathology* 45 (2-3): 53-62.
- Pourrahim, R., Farzadfar, S.H., Golnaraghi, A.R., Ahoonmanesh, A. (2007) Partial molecular characterization of some grapevine fanleaf virus isolates from North-East of Iran, *Journal of Phytopathology* 155 (11-12): 754-757.
- Rowhani, A., Chay, C., Golino, D.A. ve Falk, B.W. (1993). "Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue". *Phytopathology* 83 (7): 749-758.
- Stellmach, G. (1973). Notes on a modification in the technique for inactivating NEPO-viruses in grapes by heat treatment. *Rivista di Patologia Vegetale* 165-171.
- Tülek, B. (2014). Türkiye'nin Trakya bölgesi bağlarında kısa boğum hastalığı [grapevine fanleaf virus (GFLV)] ile vektör nematod *Xiphinema* spp. ilişkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Türkmen, Y., & Ertunç, F. (2019). Determination of Grapevine Leafroll Diseases Infection in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(11), 1947–1953.
- Türkmen, Y. (2020) Batı Karadeniz bölgesinde asma yelpaze yaprak virüsü (grapevine fanleaf Virus) ve asma pinot gris virüsü (Grapevine pinot Gris virus)'nün tespiti. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.



Research Article

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

Akife DALDA ŞEKERCİ¹, Gülşen BARUT², Hande Seda ÖZDAL^{2*}, Hasan Talha ÜNSAL²

ABSTRACT

Narcissus has become increasingly preferred as a cut flower due to its pleasant fragrance and ability to bloom during winter. The most important parameters determining the quality of cut flowers are vase life and flower quality. In this study, the effects of six different vase solutions containing nano copper, nano silver, and sodium hypochlorite on the vase life, relative fresh weight, and daily solution uptake of cut narcissus flowers were investigated. The longest vase life in cut narcissus flowers was achieved with the 20 ppm nano copper and 30 ppm nano copper applications, lasting 7.33 days, followed by the 30 ppm nano silver application with a vase life of 6.25 days. The control group recorded the shortest vase life at 4.25 days, and it was observed that vase solutions containing nanoparticles approximately doubled the vase life. Nanoparticle applications positively affected vase life and flower quality, with the addition of nano copper to the vase water showing a higher effect than nano silver, and extending vase life more than all other applications. The results indicated that, like nano silver, nano copper extends vase life by reducing antimicrobial activity and providing a nourishing effect in the vase water.

Keywords: Cut flower, narcissus, ornamental plant, nano particle, vase life

Gümüş ve Bakır Nano Partikül İçerikli Vazo Solüsyonlarının Kesme Nergis (*Narcissus L.*) Çiçeklerinin Vazo Ömrüne Etkileri

ÖZ

Nergis, hoş kokusu ve kışın çiçek açabilmesi nedeniyle son yıllarda kesme çiçek olarak yaygın şekilde tercih edilmeye başlanmıştır. Kesme çiçeklerde kaliteyi belirleyen en önemli parametreler vazo ömrü ve çiçek kalitesidir. Bu çalışmada, nano bakır, nano gümüş ve sodyum hipoklorit içeren altı farklı vazo solüsyonunun kesme nergis çiçeklerinde vazo ömrü, oransal taze ağırlık ve günlük solüsyon alımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kesme nergis çiçeklerinde en uzun vazo ömrü, 7.33 gün ile 20 ppm nano bakır ve 30 ppm nano bakır uygulamalarında elde edilirken, 30 ppm nano gümüş uygulaması 6.25 gün vazo ömrüne sahip olmuştur. Kontrol grubunda vazo ömrü en düşük 4.25 gün olarak kaydedilmiş ve nanopartikül içeren vazo solüsyonlarının vazo ömrünü yaklaşık iki kat artırdığı gözlemlenmiştir. Nanopartikül uygulamaları vazo ömrü ve çiçek kalitesini olumlu yönde etkilemiş olup, vazo suyuna ilave edilen nano bakır uygulaması, nano gümüşten daha yüksek bir etki göstermiş ve vazo ömrünü tüm diğer uygulamalardan daha fazla artırmıştır. Elde edilen sonuçlar, nano bakırın da nano gümüş gibi antimikrobiyal aktiviteyi azaltarak vazo ömrünü uzattığını ve vazo suyuna besleyici bir etki oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Kesme çiçek, nergis, süs bitkisi, nano partikül, vazo ömrü

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0001-8554-6501, 0009-0004-4814-799X, 0000-0001-5557-3138, 0000-0002-1022-7255

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 29.04.2024

Kabul Tarihi: 27.06.2024

¹ Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kayseri, Türkiye

² Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Horticulture Department, Kayseri, Türkiye

*E-posta: handesedaodal12@gmail.com

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

Introduction

Narcissus L., is a widely preferred cut flower worldwide due to its attractive appearance, pleasant fragrance, and ability to bloom in winter (Gun, 2020). Belonging to the *Amaryllidaceae* family, *Narcissus L.* is extensively cultivated in Mediterranean-climate countries, including Turkey, especially in regions with dense Mediterranean conditions (Özzambak et al., 2007). Given the limited variety of cut flowers available in winter and autumn and the feasibility of narcissus cultivation during these seasons, narcissus significantly contributes to the flower market during these times (Hunter et al., 2004; Zeybekoğlu and Özzambak, 2014). The vase life of cut flowers is a critical factor in determining cut flower quality and plays a significant role in preserving their value in the market. Maintaining the freshness of the product from harvest and ensuring a long vase life are crucial for a quality cut flower trade (Batt, 2001; Akça et al., 2019). Therefore, studies focusing on practices to extend the vase life of cut flowers starting from harvest are highly important. Various factors influence the vase life of cut flowers, including the genetic makeup of the plant, pre-harvest conditions (cultivation practices and cultural treatments), timing of harvest, and post-harvest procedures. The vase life of cut flowers tends to decrease due to various factors, primarily the clogging of microbial vessels, interruption of water uptake and transport, and depletion of respiratory substrates limiting energy for sustaining life processes (Elgimabi and Ahmed, 2009; Danaee et al., 2011; Fanourakis et al., 2013). Additionally, in ethylene-sensitive species, ethylene has an aging-accelerating effect, and reactive oxygen species (ROS) produced during oxidative stress on flower stems have harmful effects (Skutnik et al., 2021). Previous studies have also demonstrated that microbial activity in the stems of cut flowers shortens their vase life (Balestra et al., 2005), highlighting the importance of identifying vase solutions that limit microbial activity. To extend the vase life of cut flowers, various antimicrobial chemicals such as 8-hydroxyquinoline sulfate (8-HQS), silver thiosulfate (STS), aluminum sulfate, silver nitrate, and sodium hypochlorite are used in vase

solutions (Çelikel et al., 2020; Kazaz et al., 2020). The 8-hydroxyquinoline citrate has been reported to be effective in limiting the microbial population in vase solution (Islam et al., 2003; Bahrami et al., 2013; Sharifzadeh et al., 2014), while aluminum sulfate (Liao et al., 2001), sodium hypochlorite (Kathari-Lakshmaiah et al., 2019), silver nitrate (Hutchinson et al., 2013), nano-silver (Lü et al., 2010), and silicon and silver (Kiamohammadi, 2012) have been reported to extend the vase life when added to vase solution. It has been reported that sodium hypochlorite addition to the vase can reduce bacterial counts and extend the vase life of cut flowers (Halevy and Mayak, 1981; Macnish et al., 2010). Silver nitrate has been reported to act as an antimicrobial agent (van Doorn, 2010) or as an inhibitor of ethylene synthesis and ethylene action. As a vase solution treatment for cut flowers, nano silver has been found important as an antibacterial agent (Alt et al., 2004; Morones et al., 2005). Nano silver releases Ag^+ , which has been reported to interact with cytoplasmic components and nucleic acids, inhibit respiratory chain enzymes, and interfere with membrane permeability (Park et al., 2005). It is also possible that Ag^+ has positive effects on plant stem hydraulic conductivity (van Ieperen, 2007; Koohkan et al., 2014). In many studies, the antimicrobial properties of nano silver have been investigated. However, no studies on vase solutions containing nano copper have been found. Nano copper may also be a suitable vase component as it both exhibits antimicrobial properties and provides nutritional supplements. In this study, the effect of silver and copper nanoparticles on the vase life was evaluated comparatively with the commonly used chemical sodium hypochlorite. The study investigated the effects of nanoparticles added to the vase solution on the vase life and flower quality of cut narcissus flowers.

Material and Methods

Plant Material, Vase Solutions, and Environmental Conditions

The research was conducted at the pomology laboratory of Department of Horticulture, Erciyes University. The study aimed to determine the vase life and cut flower quality of

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

cut narcissus flower in different vase solutions. The narcissus flowers (*Narcissus L.*) were harvested at a commercial stage, when approximately 80% of the flowers on each stem had bloomed (Kitamura et al., 2016). Following harvest, they were transported to the laboratory under cold chain conditions without undergoing any processing. To minimize contamination in the vase life room, the stems were recut. Subsequently, they were placed in glass bottles

(1000 ml) containing 750 ml of different vase solutions. The study was designed in a randomized complete block design with three replications, each consisting of three vases with four stems per vase. A total of six different vase solutions and one control were prepared (Table 1). The experimental environment was maintained at 22-24°C room temperature and 30% humidity, aiming to simulate conditions similar to those found in a home setting.

Table 1. Contents of vase solutions for cut narcissus flowers

Treatments	Vase Solutions
T1	20 ppm Nano Copper
T2	20 ppm Nano Silver
T3	30 ppm Nano Copper
T4	30 ppm Nano Silver
T5	Sodium Hypochlorite (3mg/L)
T6	Control- tap water

The assessed characteristics encompassed vase life, relative fresh weight, and solution uptake. Vase life was documented on a daily basis, with conclusion reached upon the observation of wilting, browning of sepals, or drying of sepals in roughly 80% of the flowers (Kitamura et al., 2017). Weights of vases were measured both with and without flowers, and evaluations of fresh weight and solution uptake were conducted every other day.

Relative fresh weight (%); Relative fresh weight, expressed as a percentage, was determined by measuring the change in fresh weight using the formula: Relative Fresh Weight (%) = $(W_t/W_{t-0}) \times 100$, where W_t represents the weight of the stem (in grams) at $t = 0, 1, 2$ days, and so forth, and W_{t-0} denotes the weight of the same stem (in grams) at $t = 0$ day (He ve ark., 2006).

Solution uptake; Solution uptake was assessed on a daily basis and quantified in terms of both daily and total solution uptake. The formula for daily solution uptake is: Daily Solution Uptake (g stem⁻¹ day⁻¹) = $(St-1 - St)$, where St represents the weight (in grams) of the vase

solution on days 1, 2, 3, and so forth, and $St-1$ denotes the weight of the vase solution on the preceding day (He ve ark., 2006; Lü ve ark., 2010).

Statistical analyses

The experiment involved six treatments and followed a completely randomized design (CRD) with three replicates, each comprising three flowers. Statistical analysis of the data collected was performed using analysis of variance (ANOVA) with IBM SPSS Statistics 20.0. Mean differences were evaluated using Duncan's test ($p < 0.05$ and $p < 0.001$) to identify significant variations.

Results and Discussion

Vase Life (Day)

The vase life is terminated when the rate of wilting in flower spikes or the rate of leaf drying reaches 80% (Kitamura et al., 2017). In this study, six different vase solutions were used to evaluate the vase life of cut narcissus flowers. According to the results obtained, all nano particle and sodium hypochlorite applications increased the vase life compared to the control group. The longest vase life in cut narcissus

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

flowers was obtained with T1 (20 ppm nano copper) and T3 (30 ppm nano copper) applications, reaching 7.33 days. This was followed by the application of 30 ppm nano silver with a vase life of 6.25 days. In the control group, the vase life was the lowest at 4.25 days, while it was observed that nano particle-containing vase solutions increased the vase life by approximately two-fold (Table 2 and Figure 1). The results obtained in this study are consistent with previous researches. Most of the studies on silver nanoparticle in vase solution focused on its anti-bacterial properties and reported that it increased vase life by reducing antimicrobial activity (Solgi et al., 2009; Liu et al., 2012; Safa et al., 2015; Carrillo-López et al., 2016). In addition, there are studies evaluating the function of silver nanoparticles as anti-ethylene agents (Koohkan et al., 2014). In a similar study, they reported that silver nanoparticles reduced ethylene production and bacterial growth in the vase solution and caused the vase life of cloves to extend. In accordance with existing literature, it is plausible that in this study, the high surface area-to-volume ratio and potent antibacterial activity of silver and copper nano particles may have suppressed bacterial population growth in the vase solution and xylem vessels, consequently extending the vase life. In similar studies, various chemical substances known for their antimicrobial effects,

such as silver thiosulfate (STS), silver nitrate (AgNO_3), hydroxyquinoline sulfate (8-HQS), and hydroxyquinoline citrate (8-HQC), have been used and found to be highly effective in extending the vase life of gerbera flowers (Rahman et al., 2019; Singh et al., 2022). Previous studies have reported that the addition of silver nitrate to vase water prevents the occlusion of vascular bundles and effectively prolongs vase life (Damunupola and Joyce, 2008). In another study, it was noted that the highest vase life in cut rose flowers was achieved when the flowers were placed in preservative solutions, and sodium hypochlorite-containing vase solutions were reported to inhibit bacterial formation, thus extending vase life (Masoom et al., 2003). Norikoshi et al. (2016) indicated that sucrose application increased the concentrations of glucose and fructose within the vacuole, thereby enhancing water uptake and supporting cell expansion during flower opening. However, it has also been reported that carbohydrates, especially sucrose, may lead to an increase in bacterial populations in vase water, potentially causing blockages in the cut flower xylem vessels (Hajizadeh et al., 2012). In line with these views, nanoparticles have been observed to contribute to a longer vase life by reducing antimicrobial activity.

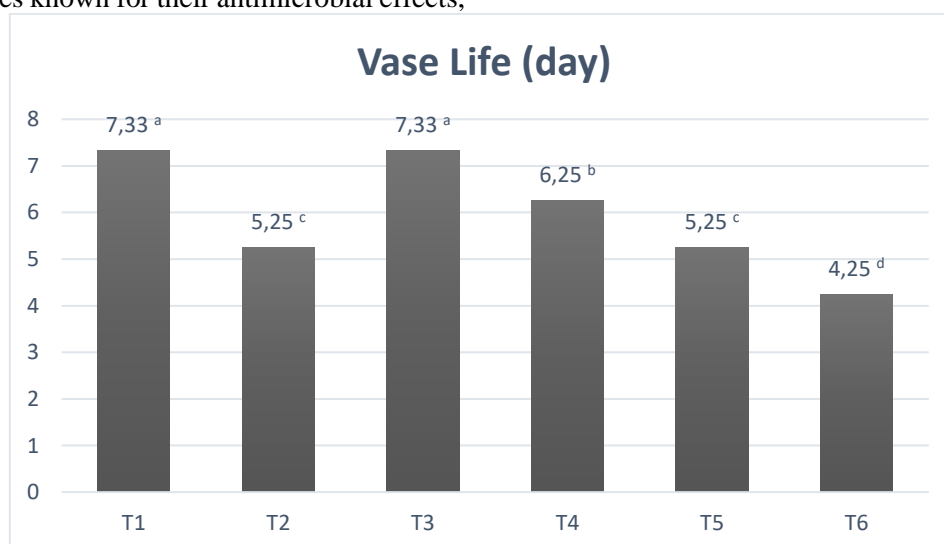


Figure 1. Graph showing the effects of different vase solutions on the vase life of cut narcissus flower

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

Table 2. Vase life periods of cut narcissus flower depending on different vase solution

Treatments	Vase Solutions	Vase Life (day)
T1	20 ppm Nano Copper	7.33 ^a
T2	20 ppm Nano Silver	5.25 ^c
T3	30 ppm Nano Copper	7.33 ^a
T4	30 ppm Nano Silver	6.25 ^b
T5	Sodium Hypochlorite (3mg/L)	5.25 ^c
T6	Control- tap water	4.25 ^d

**Means indicated with different letters in the same column are significantly different significant at $p < 0.001$



Figure 2. Visual representation of cut narcissus flowers with 30 ppm nano silver treatment.

Relative Fresh Weight Value (%) Results

Different vase solution applications were found to cause statistically significant differences in relative fresh weight among cut narcissus flowers, with applications made on days 2, 4, 6, 7, and 8 being statistically significant. Relative fresh weights of cut narcissus flowers increased during the first two days, then began to decrease after the second day (Figure 3). On the second day, relative fresh weights among treatments ranged from 103% to 140%. On the final day, flowers with the highest relative fresh weights were recorded in the application of 20 ppm nano copper (T1) and 30 ppm nano copper (T3). A positive correlation was observed between vase life and relative fresh weights (Table 3, Figure 3). In the results of this study, it is observed that as the vase life approaches its end, the relative fresh weight decreases (Figure 2). However, due

to the rapid increase in bacterial population not occurring in nano particle applications, the relative fresh weight did not decrease rapidly. It has been reported that although there was an increase in relative fresh weight throughout the vase life, a sharp decrease in relative fresh weight of the cut flower occurred due to the high number of isolated bacteria in the vase solution (Li et al., 2012). Previous studies have also indicated increases in relative fresh weights with vase applications, which continued for a certain period and then declined (Alaey et al., 2011; Ünsal, 2022). In another study, the stem fresh weight of Movie Star cut roses rapidly increased in the first 40 hours of the vase period, and then gradually decreased (Lu et al., 2011). Blockage of vessels caused by bacteria leads to reduced water uptake and ultimately results in bending, breaking of stems, and wilting of leaves in cut

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

flowers (Nair et al., 2003; Balestra et al., 2005; Meman and Dabhi, 2006; Solgi et al., 2009). Soleimany-Fard et al. (2013) noted a significant increase in relative fresh weight during the first 4 days in alstroemeria flowers, followed by a significant decrease until the end of the

experiment. Similar change patterns have been reported for cut rose flowers; proportional decreases in fresh weight in the days following harvest can be attributed to decreased water uptake (Lu et al., 2010; Alaei et al., 2011; Soleimany-Fard et al., 2013).

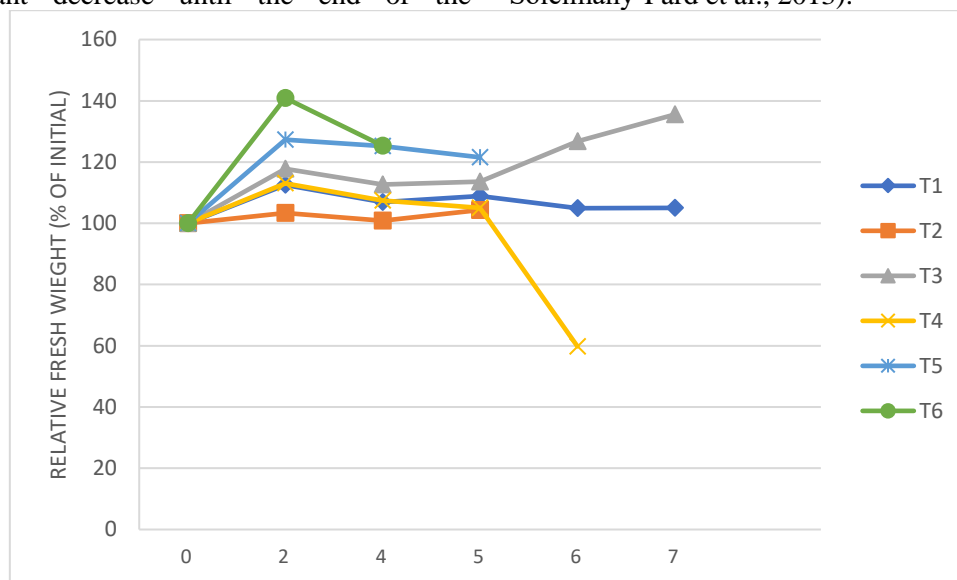


Figure 3. Graph showing changes in relative fresh weight of cut narcissus flower during vase life

Table 3. Changes in relative fresh weight of cut narcissus flowers over vase life

TREATMENTS	RFW2	RFW4	RFW5	RFW6	RFW7
T1	112,52 b	106,95 a	108,88 a	104,89 ab	105,01 b
T2	103,37 b	100,88 a	104,35 a	-	-
T3	117,83 ab	112,69 a	113,59 a	126,74 a	135,53 a
T4	113,03 ab	107,42 a	104,98 a	59,81 b	-
T5	127,31 ab	125,23 a	121,53 a	-	-
T6	140,9 a	125,34 a	-	-	-

*RFW; Relative Fresh Weight

*Means indicated with different letters in the same column are significantly different significant at $p < 0.05$

Daily Solution Uptake Results

In cut narcissus flowers, the highest solution uptake was observed in the control group at the initial measurement of daily solution uptake. The lowest daily solution uptake was recorded in the application of 20 ppm nano copper (T1). In the control group, daily solution uptake rapidly decreased after the second day, progressing towards the end of the vase life. Similarly, in sodium hypochlorite treatment, daily solution uptake stabilized after the second day. However, in nano particle applications, daily solution uptake continued until the 7th day and then

decreased, progressing towards the end of the vase life (Table 4, Figure 4). Cut flowers' quality and longevity are primarily determined by water balance, which is influenced by two main processes; water uptake and transpiration (Da Silva, 2003).

The obtained results are consistent with previous studies. Application of nano silver-containing vase solution has been reported to have positive effects on daily solution uptake in cut carnations, with the maximum solution uptake occurring on the first day and decreasing over time (Koohkan et al., 2014).

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

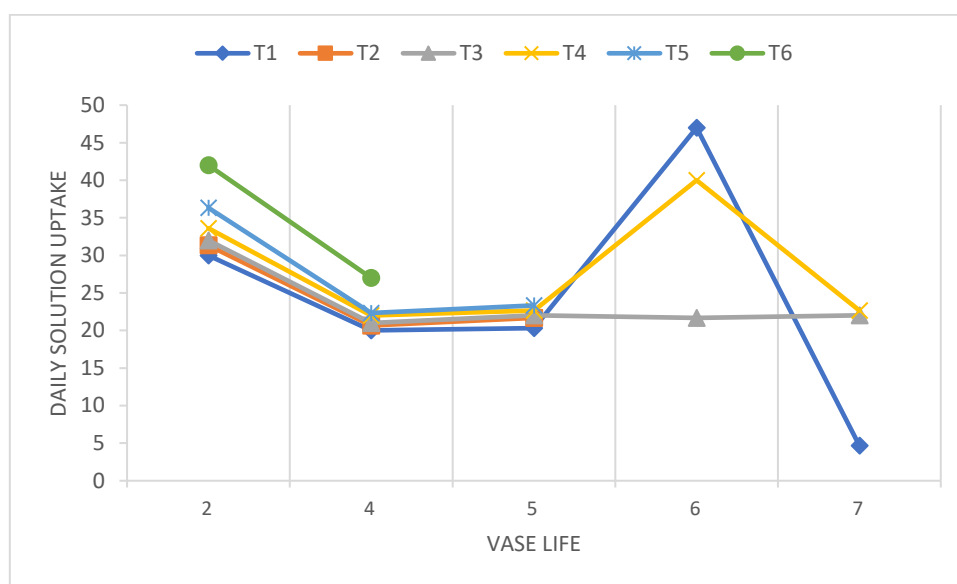


Figure 4. Graph showing changes on the daily solution uptake of cut narcissus flowers during vase life

Table 4. Changes on the daily solution uptake of cut narcissus flowers over vase life

TREATMENTS	DSU2	DSU4	DSU5	DSU6	DSU7
T1	30 a	20 b	20,33 a	47 a	4,67 b
T2	31,33 a	20,67 b	21,67 a	-	-
T3	32 a	21 ab	22 a	21,67 b	22 a
T4	33,67 a	22 ab	22,67 a	40 a	-
T5	36,33 a	22,33 ab	23,33 a	-	-
T6	42 a	27 a	-	-	-

*DSU; Daily solution uptake

*Means indicated with different letters in the same column are significantly different significant at $p < 0.05$

Conclusion

This study has determined that when the correct vase solution is used, cut narcissus flowers can have a vase life of more than 7 days. It has been found that the addition of silver and copper nanoparticles to the vase solution significantly increases vase life compared to other applications. This study is supportive of previous research demonstrating that components added to vase solutions such as sodium hypochlorite, silver nitrate, and silver nanoparticles limit microbial activity, thus increasing vase life. Previous studies have reported that silver is a potent inhibitor of ethylene effects in plant tissues; therefore, copper nanoparticles, which were hypothesized to exhibit a similar effect, were tested in this study and were found to demonstrate even higher activity than silver-

containing vase solutions. This could be attributed to the copper nanoparticle-containing vase solution not only reducing microbial activity in the vase solution but also having the ability to nourish the tissues. This study has presented an alternative method for vase solutions and contributed to the identification of a vase solution that can increase vase life by nearly double.

References

- Akça, Ş. B., Yazıcı, K., Karaelmas, D., (2019). Zonguldak İli Kesme ÇiçekPerakendecilerinin Analizi. Bartın Orman Fakültesi Dergisi, 21(3), 580-588.
- Alaey, M., Babalar, M., Naderi, R., & Kafi, M. (2011). Effect of pre-and postharvest

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

- salicylic acid treatment on physiochemical attributes in relation to vase-life of rose cut flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 91-94.
- Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Schnettler, R. (2004). An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 25(18), 4383-4391.
- Bahrami, S. N., Zakizadeh, H., Hamidoghli, Y., Ghasemnezhad, M. (2013). Salicylic acid retards petal senescence in cut lisianthus (*Eustoma grandiflorum* 'Miarichi Grand White') flowers. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 54, 519-523.,
- Batt, P. J. (2001). Strategic lessons to emerge from an analysis of selected flower export nations. *Journal of International Food and Agribusiness Marketing*, 11(3): 41-54
- Carrillo-López, L. M., Morgado-González, A., & Morgado-González, A. (2016). Biosynthesized silver nanoparticles used in preservative solutions for *Chrysanthemum* cv. Puma. *Journal of Nanomaterials*, 2016.
- Celikel, F. G., Joyce, D. C., & Faragher, J. D. (2011). Inhibitors of oxidative enzymes affect water uptake and vase life of cut *Acacia holosericea* and *Chamelaucium uncinatum* stems. *Postharvest Biology and Technology*, 60(2), 149-157.
- Da Silva, J. T. (2003). The cut flower: postharvest considerations. *J. Biol. Sci*, 3(4), 406-442.
- Damunupola, J. W., Joyce, D. C. (2008). When is a vase solution biocide not, or not only, antimicrobial. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 77(3), 211-228.
- Danaee, E., Mostofi, Y., Moradi, P. (2011). Effect of GA 3 and BA on postharvest quality and vase life of gerbera (*Gerbera jamesonii*. cv. Good Timing) cut flowers. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 52, 140-144.
- Elgimabi, M. N., Ahmed, O. K. (2009). Effects of bactericides and sucrose-pulsing on vase life of rose cut flowers (*Rosa hybrida*). *Botany Research International*, 2(3), 164-168.
- Fanourakis, D., Pieruschka, R., Savvides, A., Macnish, A. J., Sarlikioti, V., Woltering, E. J. (2013). Sources of vase life variation in cut roses: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 1-15.
- Gun, S. (2020). The effect of herbal oil and citric acid on vase life of cut narcissus (*Narcissus tazetta L.*) flower. *J Postharvest Technol*, 8(4), 18-26.
- Hajizadeh, H. S., Farokhzad, A., Chelan, V. G. (2012). Using of preservative solutions to improve postharvest life of *Rosa hybrid* cv. Black magic.
- Halevy, A. H., Mayak, S. (1981). Senescence and post-harvest physiology of cut flowers-part 11. *Horticulture Review*, 3, 59-143.
- He, S., Joyce, D.C., Irving, D.E., Faragher, J.D., (2006). Stemend blockage in cut Grevillea 'Crimson yul-lo' inflorescences. *Postharvest Biology and Technology*, 41:78-84.
- Hunter, D. A., Yi, M., Xu, X., & Reid, M. S. (2004). Role of ethylene in perianth senescence of daffodil (*Narcissus pseudonarcissus L.*'Dutch Master'). *Postharvest Biology and Technology*, 32(3), 269-280.
- Hutchinson, M. J., Muchiri, J. N., Waithaka, K. (2013). Effects of chemical preservatives and water quality on postharvest keeping quality of cut Lisianthus (*Eustoma grandiflorum L.*).
- Islam, N., Patil, G. G., Gislerod, H. R. (2003). Effects of pre-and postharvest conditions on vase life of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. *European Journal of Horticultural Science*, 68(6), 272-278.
- Kathari Lakshmaiah, M. G., Subramanian, S., & Santhi, R. (2019). Role of post-harvest

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

- treatments in improving vase life of lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) variety Mariachi Blue. *IJCS*, 7(6), 247-249.
- Kazaz, S., Kılıç, T., Doğan, E., & Sekmen, Ş. (2020). Vase life extension of cut hydrangea (*Hydrangea macrophylla*) flowers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95(3), 325-330.
- Kiamohammadi, M. (2012). The effects of different floral preservative solutions on peduncle bending and quality attributes of lisianthus cut flowers. *Acta Horticulturae*, (943), 203-208.
- Kitamura, Y., Kato, Y. Yasui, T., Aizawa, H., Ueno, S. (2017). Relation between Increases in Stomatal Conductance of Decorative Sepals and the Quality of Antique-Stage Cut Hydrangea Flowers. *The Horticulture Journal*. 86(1), 87–93
- Koohkan, F., Ahmadi, N., & Ahmadi, S. J. (2014). Improving vase life of carnation cut flowers by silver nano-particles acting as anti-ethylene agent. *Journal of Applied Horticulture*, 16(3), 210-214.
- Li, H., Huang, X., Li, J., Liu, J. Joyce, D., He, S., (2012). Efficacy of Nano-silver in Alleviating Bacteria-related Blockage in Cut Rose cv. Movie Star Stems. *Postharvest Biology and Technology*, 74, 36-41.
- Liao, L. J., Lin, Y. H., Huang, K. L., Chen, W. S. (2001). Vase life of *Eustoma grandiflorum* as affected by aluminum sulfate. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 42, 41-49.
- Liu, J., Ratnayake, K., Joyce, D. C., He, S., & Zhang, Z. (2012). Effects of three different nano-silver formulations on cut *Acacia holosericea* vase life. *Postharvest Biology and Technology*, 66, 8-15.
- Lu P, Cao J, He S, Liu J, Li H, Cheng G, Ding Y, Joyce DC., (2010). Nano-silver pulse treatments improve water relations of cut rose cv. 'Movie' Star flowers. *Postharvest Biol Technol* 57:196-202.
- Lü, P., Cao, J., He, S., Liu, J., Li, H., Cheng, G., ... Joyce, D. C. (2010). Nano-silver pulse treatments improve water relations of cut rose cv. Movie Star flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), 196-202.
- Lü, P., Huang, X., Li, H., 2011. Continuous Automatic Measurement of Water Uptake and Water Loss of Cut Flower Stems. *Hortscience* 46, 509-512.
- Macnish, A. J., Leonard, R. T., Borda, A. M., & Nell, T. A. (2010). Genotypic variation in the postharvest performance and ethylene sensitivity of cut rose flowers. *HortScience*, 45(5), 790-796.
- Memman, M. A., Dabhi, K. M. (2006). Effects of different stalk lengths and certain chemical substances on vase life of gerbera (*Gerbera jamesonii* Hook.) cv. 'Savana Red'. *Journal of Applied Horticulture*, 8(2), 147-150.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- Nair, S.A., Singh, V., Sharma, T.V.R.S., (2003). Effect of chemical preservatives on enhancing vase-life of gerbera flowers. *J. Trop. Agric.* 41, 56–58.
- Norikoshi, R., Shibata, T., Niki, T., Ichimura, K. (2016). Sucrose treatment enlarges petal cell size and increases vacuolar sugar concentrations in cut rose flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 116, 59-65
- Özzambak, E., Zeybekoğlu, E., & Kahraman, Ö. (2007). Süs bitkileri yetiştiriciliğinde iyi tarım uygulamaları. *Ege Üniv. Zir. Fak. Matbaası*, 97-106.
- Park, S. H., Oh, S. G., Mun, J. Y., & Han, S. S. (2005). Effects of silver nanoparticles on the fluidity of bilayer in phospholipid

The Effects of Silver and Copper Nano Particle-Infused Vase Solutions on the Vase Life of Cut Narcissus (*Narcissus L.*) Flowers

- liposome. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44(2-3), 117-122.
- Rahman, M. M., Ahmad, S. H., Mohamed, M. T. M., & Ab Rahman, M. Z. (2019). Improving the vase life of cut Mokara red orchid flower using leaf extracts with silver nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89, 1343-1350.
- Safa, Z., Hashemabadi, D., Kaviani, B., Nikchi, N., & Zarchini, M. (2015). Studies on quality and vase life of cut *Gerbera jamesonii* cv.'Balance'flowers by silver nanoparticles and chlorophenol. *Journal of Environmental Biology*, 36(2), 425.
- Sharifzadeh, K., Asil, M. H., Roein, Z., Sharifzadeh, M. (2014). Effect of 8-hydroxyquinoline citrate, sucrose and peroxidase inhibitors on vase life of lisianthus (*Eustoma grandiflorum* L.) cut flowers. *Journal of Horticultural Research*, 22(1), 41-49.
- Singh, K., Sharma, R., Sahare, H. (2022). Implications of synthetic chemicals and natural plant extracts in improving vase life of flowers. *Scientia Horticulturae*, 302, 111133.
- Skutnik, E., Łukaszewska, A., Rabiza-Świder, J. (2021). Effects of postharvest treatments with nanosilver on senescence of cut lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) flowers. *Agronomy*, 11(2), 215.
- Soleimany-Fard, E., Hemmati, K., Khalighi, A. (2013). Improving the keeping quality and vase life of cut alstroemeria flowers by pre and post-harvest salicylic acid treatments. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(3), 364-370
- Solgi, M., Kafi, M., Taghavi, T. S., & Naderi, R. (2009). Essential oils and silver nanoparticles (SNP) as novel agents to extend vase-life of gerbera (*Gerbera jamesonii* cv.'Dune') flowers. *Postharvest biology and technology*, 53(3), 155-158.
- Solgi, M., Kafi, M., Taghavi, T. S., Naderi, R. (2009). Essential oils and silver nanoparticles (SNP) as novel agents to extend vase-life of gerbera (*Gerbera jamesonii* cv.'Dune') flowers. *Postharvest biology and technology*, 53(3), 155-158.
- Ünsal, H. T. (2022). Hasat sonrası ön uygulamaların kesme gül (*Rosa hybrida* L.) çiçeklerinin vazo ömrü ve çiçek kalitesine etkisi, Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- van Doorn, W. G. (2010). Water relations of cut flowers. *Horticultural reviews*, 18, 1-85.
- van Ieperen, W. (2007). Ion-mediated changes of xylem hydraulic resistance in planta: fact or fiction. *Trends in Plant Science*, 12(4), 137-142.
- Zeybekoğlu, E., & Özzambak, E. (2014). Effects of different solutions applied during hydration process on vase life of cut narcissus before and after storage.



Araştırma Makalesi

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

Çiğdem BOZKIR^{1*}, Tuğçe KARTAL², Ezgi AK³

ÖZ

Bu çalışma, Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda çalışan 200 infaz ve koruma memurunun vardiyalı çalışma sistemi ve beslenme alışkanlıkları arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Çalışmaya katılan bireylere demografik özellikleri ve beslenme alışkanlıklarını sorgulayan anket uygulanmıştır. Sonuçlar, vardiyalı çalışanların %12.5'inin öğün atlamadığını, öğün atlayanların ise en sık sabah (%39.3) ve öğle/akşam (%48.2) öğünlerini atladığını göstermiştir. Üç yıldan fazla vardiyalı çalışanların beden kütle indeksi (BKİ) ortalamalarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Gece vardiyalarında tüketilen besinlerin ve öğün düzeninin BKİ değerlerinde artışa yol açabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beslenme alışkanlıkları, vardiyalı çalışma, beden kütle indeksi

Shift Work and Nutritional Behaviour: An Assessment on Employees at Tekirdağ T Type Closed Penal Institution

ABSTRACT

This study aims to evaluate the relationship between shift work and nutritional habits among 200 correctional officers working at the Tekirdağ T Type Closed Penal Institution. Participants were surveyed about their demographic characteristics and dietary habits. The results indicated that 12.5% of shift workers did not skip meals, while those who did skip meals most frequently skipped breakfast (39.3%) and lunch/dinner (48.2%). It was found that the average body mass index (BMI) of those working in shifts for more than three years was significantly higher ($p<0.05$). It is suggested that the foods consumed and meal timing during night shifts may lead to an increase in BMI values.

Keywords: Nutrition habits, shift work, body mass index

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-1103-6290, 0000-0003-1498-3696, 0009-0006-9679-2429

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 17.05.2024

Kabul Tarihi: 27.06.2024

¹ İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Malatya

² Çukurova Üniversitesi Hastanesi, Beslenme ve Diyet Bölümü, Adana

³ Marmara Açık Ceza İnfaz Kurumu, İstanbul

*E-posta: bozkircgdm@gmail.com

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

Giriş

Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde çalışan nüfusun yaklaşık %30'u sağlık, endüstriyel imalat, madencilik, ulaştırma, iletişim, eğlence ve konaklama gibi farklı sektörlerde gece saatlerini de kapsayan vardiyalı sistem ile çalışmaktadır (International Agency for Research on Cancer, 2020). Türkiye'de ise vardiyalı sistem ile çalışanların oranının %11 olduğu bilinmektedir (European Foundation for the Improvement of Living and Working Conditions, 2019). Vardiyalı çalışanlar ile yürütülen birçok epidemiyolojik araştırmada, kardiyovasküler hastalık, diyabet, metabolik sendrom ve bazı kanser türleri dahil birçok kronik hastalık riskinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Wang ve ark., 2011). Ayrıca bu çalışma sisteminin, beslenmenin zamansal dağılımını ve kalitesini etkileyebileceği bilinmektedir (Peplowska ve ark., 2019). Uyku bozuklukları ve obezite prevalanslarının gece vardiyasında çalışanlarda gündüz çalışanlara göre daha yüksek olduğu ve altta yatan olası mekanizmalardan birinin de sirkadiyen ritmin bozulmasının olduğu düşünülmektedir (Boivin ve Boudreau, 2014; Peplowska ve ark., 2015). Öğünlerin sirkadiyen zamanlamasındaki farklılıklar; sindirim, besin emilimi, enzim aktivitesi ve metabolik süreçlerin yanı sıra açlık, iştah ve tokluk hisleri üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Haus ve Smolensky, 2006).

Vardiyalı çalışma sistemi ile beslenme arasındaki ilişki, 1960'lı yılların ortalarından beri araştırılmaktadır. Lowden ve ark. 1967-2009 yılları arasında yayınlanmış, vardiyalı çalışma ile beslenme alışkanlıkları arasındaki olası ilişkiyi değerlendiren 21 araştırma çıktısı olarak vardiyalı çalışmanın, gün boyunca beslenmenin zamansal dağılımını, beslenme kalitesini ve enerji dağılımını önemli ölçüde etkilediği sonucuna varılmıştır (Lowden ve ark., 2010).

Vardiya türleri veya vardiya çalışanları ile vardiyasız çalışanlar arasında günlük toplam enerji alımında farklılık olmadığı ya da sınırlı farklılıklar olduğu yapılan çalışmalarla gösterilirken (Cayanan ve ark., 2019; Gupta ve ark., 2019; Lauren ve ark., 2020; Shaw ve ark., 2019), akşam veya gece vardiyasında çalışmanın

daha az protein ve/veya daha fazla karbonhidrat, toplam şeker, yağ veya alkol tüketimiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (Chen ve ark., 2018; Dorrian ve ark., 2017; Heath ve ark., 2019; Shaw ve ark., 2019). Vardiyalı çalışmanın diyetle ilgili en belirgin etkilerinden biri, aç kalma/beslenme döngüsünün genel olarak yer değiştirmesi ve bunun gün içindeki öğün zamanlaması üzerindeki etkisidir (Kosmadopoulos ve ark., 2020). Öğün tüketiminin zamansal dağılımının incelendiği çalışmalarda, vardiyalı çalışmanın, daha farklı öğünler, daha az ve küçük porsiyonlarda kahvaltı, daha geç yemek saatleri ve gece boyunca artmış enerji alımı ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Heath ve ark., 2012; Shaw ve ark., 2019).

Beslenme çalışmalarında, porsiyon büyüklüğü ve makro besin öğeleri gibi faktörler önemli olsa da metabolizmayı etkileyen fizyolojik süreçler üzerindeki etkisi nedeniyle öğün zamanlamasının sağlık üzerindeki rolüne olan ilgi giderek artmaktadır (Banks ve ark., 2015; Mason ve ark., 2020). Bu konu ile ilgili vardiyasız çalışan bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda, günün geç saatlerinde veya gece öğün tüketiminin bozulmuş glukoz metabolizması, toplam enerji alımında artış ve yetersiz ağırlık kaybı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Centofanti ve ark., 2017; Lopez-Minguez ve ark., 2018; Reid ve ark., 2014). Vardiyalı çalışma sisteminde, uyku-uyanıklık sürelerini değiştirmek için esneklik sağlanamazken, uzun vadeli sağlık risklerini azaltmak için diyet ve beslenme alışkanlıkları değiştirilebilir müdahalelere olanak sağlamaktadır (Dashti ve ark., 2019).

Ceza infaz kurumlarında çalışanlar özellikle güvenlik gözetim hizmetini yerine getiren infaz ve koruma memurları, dönüşümlü olarak on ikişer saatlik vardiyalar halinde çalışmaktadırlar (Anonim, 2006). Bu nedenle mevcut araştırma, Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumları'nda çalışan infaz ve koruma memurlarının çalışma sistemleri ve beslenme alışkanlıkları ilişkisini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

Gereç ve Yöntem

Araştırmanın Yeri ve Örnekleme

Tanımlayıcı kesitsel tipte olan bu çalışma 2020 yılı Nisan-Mayıs aylarında Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurum çalışanlarıyla yürütülmüştür. Araştırmanın evrenini cezaevinde çalışan infaz ve koruma memurları oluşturmaktadır. Örneklem hesabı yapmadan evrenin tamamına ulaşılması hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında 247 kişiye ulaşıldı ancak, çalışmaya katılmayı kabul ederek onam formu alınan 185'i erkek, 15' i kadın toplam 200 katılımcı çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmanın yürütülmesi için kurum izni ve Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (25/03/2020 tarihli ve 46048792-050.01.04-E numaralı) onay alınmıştır.

Veri Toplama Aracı

Araştırmacılar tarafından hazırlanan ve iki bölümden oluşan anket formu yüz yüze görüşme yöntemiyle katılımcılara uygulanmıştır. Anket formunun birinci kısmında bireylerin yaş, cinsiyet, eğitim durumu gibi sosyodemografik özellikleri ile vücut ağırlığı, boy uzunluğu bilgileri sorgulandı. Beden kütle indeksi (kg/m^2) araştırmacılar tarafından hesaplanırken anket formunun ikinci kısmında da beslenme alışkanlıklarına ilişkin sorulara ve besin tüketim sıklığı formuna yer verildi.

İstatistiksel Analiz

Araştırmada verilerinin istatistiksel olarak analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 22.0 paket programı kullanıldı. Kategorik verilerin dağılımı sayı-yüzde olarak belirtilmiştir. Katılımcıların, yaş, boy, vücut ağırlığı, beden kütle indeksi (BKİ) değerleri gibi nicel veriler için ortalama, standart sapma değerleri, maksimum ve minimum değerleri kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkileri incelemek için Pearson ki-kare analizi uygulanmıştır. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile yapılmıştır. Nicel değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için Pearson korelasyon testi, iki gruba ait nicel bulguların kıyaslanması için ise bağımsız gruplar t-testi; ikiden fazla grup kıyaslaması için One way Anova testi

ya yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizler için anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Vardiyalı çalışma sistemleri uyku-uyanıklık sürelerini değiştirmeye izin vermese de uzun vadeli sağlık risklerini azaltmak için bireysel ihtiyaçlar ve çalışma sistemine göre çalışanların diyet modellerinin değiştirilebileceği bildirilmiştir (Dashti ve ark., 2019). Vardiyalı ve vardiyasız sistemde gündüz çalışanlar arasındaki besin tüketimini karşılaştıran çalışmalar, toplam günlük enerji veya makro besin ögesi alımında anlamlı farklılıklar bulamamıştır (Bonham ve ark., 2016).

Araştırma grubunun yaş ortalaması 33.7 ± 7.1 yıl olup, %7.5'i kadınlardan, %92.5'i erkeklerden oluşmaktadır. Beden kütle indeksi ortalaması 25.9 ± 2.7 (kg/m^2) olan katılımcılar Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasına (WHO, 2010) göre değerlendirildiğinde katılımcıların %39'unun normal veya zayıf, %52'sinin preobez ve %9'unun obez olarak tanımlanan aralıkta olduğu belirlenmiştir. Araştırmaya dâhil edilen çalışanların %16'sının vardiyasız, %84'ünün ise vardiyalı sistem ile çalıştığı saptanmıştır. Vardiyalı sistem ile çalışanların, aylık gündüz ve gece vardiya sayılarının 8 gündüz ve 8 gece olduğu ve %48.2'sinin 3 yılın üzerinde bu sistemle çalıştığı görülmüştür (Çizelge 1).

Katılımcıların son bir aya ait besin tüketim sıklıkları sorgulandığında, süt ve süt ürünlerinden; tulum peynirini (%62) hiç tüketmeyenlerin, beyaz peyniri ise her gün tüketenlerin (%59.5) oranının yüksek olduğu görülmüştür. Katılımcıların %34'ü yumurtayı her gün ve %40'ının gün aşırı, %54.5'inin tavuk etini; %45.5'inin kırmızı eti ve %30'unun işlenmiş et ürünlerini haftada bir tükettiklerini belirtmiştir. Yeşil yapraklı sebzeler (%35), diğer sebzeler (%41) ve turunçgilleri (%36) katılımcıların en az üçte birinin haftada bir tükettikleri görülmüştür. Çalışanların büyük bir oranı, beyaz ekmeği (%71.5) her gün tükettiğini, tam tahıllı ekmeği (%55) ise tüketmediğini belirtmiştir. Sıvı yağ (%56.5), zeytinyağı (%42.5) ve tereyağının (%28.5) katılımcılar tarafından sıklıkla her gün tüketildiği belirlenmiştir. Katılımcıların %28'inin meyve

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

sularını haftada bir tükettikleri, %88.5'inin çayı ve %59.5'inin kahveyi her gün tükettikleri tespit edilmiştir (Çizelge 2). Araştırma grubunun günlük öğün sayısı sorgulandığında katılımcıların %11.5'i 4 ve üzerinde, %48.5'i üç; %38.5'i iki ve %1.5'i de bir öğün yaptığını ifade etmiştir. Tüm katılımcılarda en sık atlanan öğünün kahvaltısı (%44) ve öğle öğünü (%39.5)

olduğu tespit edilmiştir. Katılımcılar tarafından öğün atlama nedeni olarak sırasıyla; düzensiz çalışma saatleri (%23.3), sabah geç uyanma (%22.3), iştahsızlık (%19.9), zaman bulamama (%9.7), zayıflama isteği (%5.8), yemekleri beğenmeme (%4.9) ve yemek hazırlamanın zor gelmesi (%4.4) nedenleri gösterilmiştir.

Çizelge 1. Katılımcıların genel özelliklerinin dağılımı

	Ortalama \pm SS	Ortanca (Alt-Üst)
Yaş (yıl)	33.7 \pm 7.1	32 (22-58)
Ağırlık (kg)	82.1 \pm 10.5	82 (45-104)
Boy (cm)	177.7 \pm 6.4	178 (150-193)
BKİ (kg/m²)	25.9 \pm 2.7	25.8 (17.6-33.5)
	n (200)	%
Cinsiyet		
Kadın	15	7.5
Erkek	185	92.5
Medeni durum		
Evli	131	65.5
Bekâr	69	34.5
Eğitim düzeyi		
Lise	78	39.0
Üniversite	122	61.0
Çocuk Sayısı		
0	88	44.0
1	49	24.5
2 \leq	63	31.5
Çalışma düzeni		
Vardiyasız	32	16.0
Vardiyalı	168	84.0
Vardiyalı Çalışma Süresi		
<1 yıl	30	17.9
1-3 yıl	57	33.9
3 yıl<	81	48.2
BKİ (kg/m²) sınıflandırma		
<25	78	39.0
25-29.9	104	52.0
30 \leq	18	9.0

BKİ: Beden kütle indeksi, n: sayı, %: frekans

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

Çizelge 2. Katılımcıların son bir aya ait besin grupları tüketim sıklıklarının dağılımı

Besin Grupları	Tüketim Sıklıkları					
	Her gün	Gün aşırı	Haftada bir	Ayda iki	Ayda bir	Hiç
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Süt ve Süt Ürünleri						
Süt	20(10)	36 (18)	62 (31)	18 (9)	21 (10.5)	43 (21.5)
Yoğurt	75 (37.5)	78 (39)	22 (11)	10 (5)	6 (3)	9 (4.5)
Ayran	54 (27)	66 (33)	52 (26)	11 (5.5)	1 (0.5)	16 (8)
Beyaz Peynir	119(59.5)	47 (23.5)	18 (9)	6 (3)	2 (1)	8 (4)
Tulum Peyniri	12 (6)	13 (6.5)	22 (11)	10 (5)	19 (9.5)	124 (62)
Kaşar	38 (19)	59 (29.5)	52 (26)	19 (9.5)	9 (4.5)	23 (11.5)
Et, Yumurta, Kurubaklagil						
Kırmızı Et	11 (5.5)	42 (21)	91 (45.5)	30 (15)	17 (8.5)	9 (4.5)
Sakatatlar	6 (3)	11 (5.5)	44 (22)	25(12.5)	48 (24)	66 (33)
Tavuk	11 (5.5)	36 (18)	109(54.5)	25(12.5)	11 (5.5)	8 (4)
Balık	2 (1)	10 (5)	48 (24)	53(26.5)	59(29.5)	28 (14)
Yumurta	68 (34)	80 (40)	32 (16)	5 (2.5)	3 (1.5)	12 (6)
Sucuk/Sosis/Salam	7 (3.5)	32 (16)	60 (30)	27(13.5)	16 (8)	58 (29)
Kuru baklagiller	18 (9)	53 (26.5)	96 (48)	12 (6)	3 (1.5)	18 (9)
Ceviz, badem vb.	29 (14.5)	37 (18.5)	65 (32.5)	26 (13)	17 (8.5)	26 (13)
Sebze ve Meyveler						
Yeşil yapraklı sebzeler	39 (19,5)	56 (28)	70 (35)	12 (6)	6 (3)	17 (8.5)
Diğer sebzeler	19 (9.5)	45 (22.5)	82 (41)	15 (7.5)	6 (3)	33 (16.5)
Patates	17 (8.5)	69 (34.5)	90 (45)	11 (5.5)	6 (3)	7 (3.5)
Turunçgiller	31 (15.5)	56 (28)	72 (36)	17 (8.5)	5 (2.5)	19 (9.5)
Diğer meyveler	30 (15)	75 (37.5)	56 (28)	18 (9)	6 (3)	15 (7.5)
Kuru meyveler	10 (5)	26 (13)	57 (28.5)	30 (15)	23(11.5)	54 (27)
Ekmek ve Tahıllar						
Beyaz ekmek	143(71.5)	21 (10.5)	3 (1.5)	2 (1)	3 (1.5)	28 (14)
Tam tahıllı ekmek	34 (17)	15 (7.5)	26 (13)	6 (3)	9 (4.5)	110 (55)
Pirinç	34 (17)	62 (31)	81(40.5)	6 (3)	5 (2.5)	12 (6)
Bulgur	15 (7.5)	40 (20)	105(52.5)	16 (8)	5 (2.5)	19 (9.5)
Makarna	11 (5.5)	39 (19.5)	104 (52)	21(10.5)	10 (5)	15 (7.5)
Simit, börek, pasta vb.	5 (2.5)	25 (12.5)	102 (51)	27(13.5)	17 (8.5)	24 (12)
Yağlı ve Şekerli Ürünler						
Bal, reçel, pekmez	55 (27.5)	68 (34)	32 (16)	8 (4)	10 (5)	27 (13.5)
Zeytinyağı	85 (42.5)	41 (20.5)	33 (16.5)	6 (3)	6 (3)	29 (14.5)
Diğer bitkisel yağlar	113(56.5)	38 (19)	13 (6.5)	2 (1)	4 (2)	30 (15)
Tereyağı	57 (28.5)	39 (19.5)	47 (23.5)	7 (3.5)	10 (5)	40 (20)
Margarin	20 (10)	37 (18.5)	33 (16.5)	14 (7)	9 (4.5)	87 (43.5)
Hamur tatlıları	5 (2.5)	18 (9)	69 (34.5)	36 (18)	30 (15)	42 (21)
Sütlü tatlılar	5 (2.5)	23 (11.5)	76 (38)	43(21.5)	28 (14)	25 (12.5)
Şeker	85 (42.5)	24 (12)	20 (10)	7 (3.5)	7 (3.5)	57 (28.5)

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

Çizelge 2'nin devamı

Fastfood Tarzı Yiyecekler						
Hamburger	1 (0.5)	4 (2)	26 (13)	19 (9.5)	45 (22.5)	105 (52.5)
Tost	7 (3.5)	34 (17)	80 (40)	23 (11.5)	23 (11.5)	33 (16.5)
Çikolata	39 (19.5)	61 (30.5)	57 (28.5)	13 (6.5)	6 (3)	24 (12)
Kurabiye / Bisküvi / Kraker	32 (16)	58 (29)	58 (29)	19 (9.5)	14 (7)	19 (9.5)
Patates /mısır cipsleri	12 (6)	32 (16)	66 (33)	22 (11)	19 (9.5)	49 (24.5)
İçecekler						
Meşrubat	53 (26.5)	30 (15)	46 (23)	9 (4.5)	8 (4)	54 (27)
Meyve suları	38 (19)	30 (15)	56 (28)	20 (10)	7 (3.5)	49 (24.5)
Çay	177 (88.5)	11 (5.5)	10 (5)	-	-	2 (1)
Bitki çayları	29 (14.5)	22 (11)	25 (12.5)	14 (7)	17 (8.5)	93 (46.5)
Kahve	119 (59.5)	32 (16)	22 (11)	5 (2.5)	6 (3)	16 (8)

n: sayı, %: frekans

Sağlık çalışanları ile yapılmış bir araştırmada vardiyalı çalışanların sıklıkla sandviç, kek, patates cipsi ve bisküvi tükettiği bildirilirken (Fernandes ve ark., 2013), gece vardiyasında çalışanların sabah ve öğleden sonra çalışanlara göre daha az miktarda meyve ve sebze tükettiği, doymuş yağ asidi içeren kızarmış yiyecekleri daha fazla tükettikleri rapor edilmiştir (Canuto ve ark., 2021; Khorasaniha ve ark., 2020; Newby ve Tucker, 2004). Bir diğer araştırmada ise, doktorların fazla mesai saatlerinin sayısındaki artış ile yetersiz meyve tüketiminin pozitif yönde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mota ve ark., 2014). Mevcut araştırmada ise, gece vardiyasında çalışanların %32.1'i geceleri daha sık acıktıklarını; acıktıklarında da sıklıkla sırasıyla, kraker/bisküvi vb. (%71.2), çorba (%13.1), meyve (%9.4) ve simit, poğaç vb. (%6.3) tükettiklerini ifade etmiştir. Literatür ile benzer olarak mevcut çalışmada da sağlıklı besin alternatiflerinin gece vardiyasında sıklıkla tüketilmesinin, bu bireyler için obezite riskini arttıran nedenlerden biri olabileceğini düşündürmüştür.

Sağlıklı bir beslenme modelinde yetişkinlerin günde 4-5 öğün tüketmesi önerilmektedir. Daha az miktarda sık öğün tüketimi, ortaya çıkabilecek hipoglisemiye ve hiperinsülinemiye karşı koruma sağlamaktadır (Łokiec ve Górska-Ciebiada, 2020). Yapılan bir araştırmada, sağlık çalışanlarının %60'ından fazlası günde en az 4 öğün yemek tükettiğini belirtmiş ve

katılımcıların çalışma şekline göre öğün sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Wolska ve ark., 2022). Benzer şekilde Kucharska ve arkadaşlarının, yaptıkları bir çalışmada ise hemşirelerin %50'sinin günde 4 ila 5 öğün yemek yediği gösterilmiştir (Alicja Kucharska ve ark., 2018). Kahleova ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada da günde 3'ten fazla öğün yapanların BKİ değerlerinde göreceli bir artış yaşandığı ve günde ne kadar çok öğün ve atıştırmalık tüketilirse BKİ değerlerindeki artışın da o kadar büyük olduğu görülmüştür (Kahleova ve ark., 2017). Bu çalışmada, vardiyalı çalışanların %12.5'inin, vardiyalı çalışmayanların ise %6.2'sinin 4 ve üzeri öğün yaptığı belirlenmiştir. Vardiyalı çalışanların BKİ değerleri günlük öğün sayısı ile kıyaslandığında 4 ve üstünde öğün yapanların, 3 öğün ve 1-2 öğün yapanlardan anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Çalışma sistemine göre BKİ sınıflandırması değerlendirildiğinde; vardiyasız çalışanların %40.6'sının normal veya zayıf, %50'sinin preobezite, %9.4'ünün ise obezite olarak tanımlanan aralıklarda olduğu tespit edilmiştir. Vardiyalı çalışanlarda bu oranlar sırasıyla %38.7; %52.4; %8.9 olarak belirlenmiş ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$) (Çizelge 3).

Yapılan çalışmalarda vardiyalı çalışma sistemi ile beslenme alışkanlıklarının değişiklik gösterdiği, vardiyalı çalışanların sıklıkla öğün

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

atladığı ve en çok atlanan öğünün öğle ve/veya kahvaltı olduğu saptanmıştır. Gündüz vardiyasında genellikle öğle öğünü; gece vardiyasında kahvaltı öğününün atlandığı bildirilmiştir (Gifkins ve ark., 2020; Kalmbach ve ark., 2018; Lemke ve ark., 2016). Çalışmamızda ise, vardiyalı çalışma gününde bireylerin %73.3'ünün öğün atladığı, en çok atlanan öğünün ise öğle veya akşam öğünü (%48.2) olduğu görülmüştür.

Smith ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada, gündüz çalışanlarla karşılaştırıldığında, gece veya karma vardiya programlarında çalışan kadın hemşirelerin BKİ değerlerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Smith ve ark., 2013). Vardiyalı çalışan işçilerde beslenme durumu, uyku kalitesi ve metabolik sendrom arasındaki ilişkinin değerlendirildiği bir araştırmada ise, vardiyalı çalışan bireylerde BKİ değerlerinin diğer gruba kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Çakmak ve Kızıl, 2018). Katılımcıların eğitim düzeyleri ve medeni durumlarının BKİ değerlerine etkisi incelendiğinde, BKİ değerlerinin ortalamaları evlilerin, bekârlardan; üniversite mezunlarının ise lise mezunlarından yüksek olduğu ancak aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Vardiyalı çalışanların BKİ değerlerinin vardiyalı çalışmayanlara göre daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve 3 yıldan fazla vardiyalı çalışanların BKİ ortalamalarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$) (Çizelge 4).

Çalışanların BKİ değerleri ile yaş, vardiyalı çalışma süresi, gece vardiyasında çalışma ve çocuk sayısı ile korelasyonuna bakıldığında BKİ değerleri ile vardiyalı çalışma ve çocuk sayısı arasında pozitif yönlü anlamlı bir korelasyon görülmüştür ($p<0.01$). Bir araştırmada çalışmamızla benzer şekilde vardiyalı çalışan hemşirelerin BKİ değerlerinde çalışılan her 5 yıl için ortalama 0.17'lik bir artış olduğu saptanmıştır (Books ve ark., 2020). Vardiyalı

çalışma yılı arttıkça BKİ değerlerinin artması, sirkadiyen ritmin bozulması sonucu dengesiz enerji ve besin ögesi alımı sonucu obeziteye yatkınlığın artışından kaynaklı olabilir.

Vardiyalı çalışan katılımcıların %77.4'ünün çalışma sisteminden olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Çalışma sisteminden olumsuz etkilendiğini belirtenlerin %80'i yaşam kalitesinin, %79'u uyku düzeninin ve beslenme düzeninin olumsuz etkilendiğini ifade etmiştir. Katılımcıların vardiyalı çalışma sisteminin beslenme alışkanlıklarına etkisi sorgulandığında; öğün saatlerinin değişmesi (%37), öğün atlama (%23), normalden çok yemek yeme davranışı (%16) ve az yeme davranışı (%4) gibi değişiklikler bildirilmiştir (Şekil 1). Vardiyalı çalışan katılımcılar çalışma sistemleri nedeniyle sırasıyla; sindirim sistemi sorunları (%16), stres (%14), uykusuzluk (%12) ve kronik yorgunluk (%12) gibi sorunları daha çok yaşadıklarını ifade etmiştir.

Katılımcıların %37.5'i yeterli ve dengeli beslendiğini düşünürken %62.5'i yeterli ve dengeli beslenmediğini düşündüğünü belirtmiştir. Gündüz vardiyasında sabah, öğle ve akşam öğünlerini tüketme oranları sırasıyla %63.5, %95 ve %92.5; gece vardiyasında ise %48.2, %45.8 ve %94.0 olarak tespit edilmiştir. Dinlenme gününde sabah öğünün tüketilme oranının %78'e çıktığı, öğle ve akşam öğünlerinin tüketilme oranının da %71.5 ve %97.0 olduğu görülmüştür ($p<0.05$).

Arizona Üniversitesinde vardiyalı çalışanlar ile yapılan bir araştırmada katılımcıların %60'nın uykusuzluk nedeniyle daha fazla abur cubur yeme isteklerinin oldukları rapor edilmiştir (Sanchez ve ark., 2018). Gece saatlerinde besin tüketimi arttığında enerji alımı artar ancak enerji harcanması herhangi bir fiziksel aktivite yapılmadığı sürece düşer. Sonuç olarak gece besin alımının artması obezite, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalık riskini vardiyalı çalışma sisteminde olan bireyler için artırabilir (Azmi ve ark., 2020).

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

Çizelge 3. Çalışma düzeninin bazı beslenme alışkanlıkları ve BKİ değerlerine etkisi

	Çalışma Düzeni				p
	Vardiyasız		Vardiyalı		
Günlük öğün sayısı	n	%	n	%	
1-2 öğün	6 ^a	18.8	74 ^b	44.0	
3 öğün	24 ^a	75.0	73 ^b	43.5	0.005
4 öğün ≥	2 ^a	6.2	21 ^a	12.5	
En Sık Atlanan Öğün					
Öğün atlamıyor	6 ^a	18.8	21 ^a	12.5	
Sabah	22 ^a	68.7	66 ^b	39.3	0.003
Öğle/ Akşam	4 ^a	12.5	81 ^b	48.2	
BKİ (kg/m²)*					
<25	13	40.6	65	38.7	
25-29.9	16	50.0	88	52.4	0.902
30≤	3	9.4	15	8.9	
Toplam	32	100	168	100	

BKİ: beden kütle indeksi, n: sayı, %: frekans, Pearson kıkare, $p < 0,05$. a, b den farklıdır. *DSÖ'ye göre sınıflandırılmıştır.

Çizelge 4. Farklı değişkenlerin BKİ değerlerine etkisi

Değişkenler	BKİ (kg/ m ²)		p
	Ortalama ±SS	Ortanca (Alt-Üst)	
Medeni Durum			
Evli	26.63 ± 2.66	26.36 (19.57-33.51)	0.408
Bekâr	24.65 ± 2.51	24.69 (17.58-31.02)	
Eğitim Durumu			
Lise	25.78 ± 2.64	25.55 (19.44-31.56)	0.390
Üniversite	26.05 ± 2.85	25.91 (17.58-33.51)	
Çalışma düzeni			
Vardiyasız	25.90 ± 2.80	25.64 (20.76-31.35)	0.894
Vardiyalı	25.95 ± 2.77	25.84 (17.58-33.51)	
Vardiyalı Çalışma Süresi			
<1 yıl	25.44 ± 2.49 ^a	25.28 (20.76-31.35)	0.007*
1-3 yıl	25.43 ± 2.59 ^a	25.56 (17.58-30.74)	
3 yıl<	26.69 ± 2.94 ^b	26.47 (19.57-33.51)	

BKİ: beden kütle indeksi, SS: standart sapma, Independent group t test, * One way Anova test, $p < 0,05$. a, b den farklıdır.

Sonuç ve Öneriler

Vardiyalı çalışma sisteminin beraberinde getirdiği sirkadiyen ritimde bozulma sonucu sağlıksız beslenme alışkanlıklarının arttığı bilinmektedir. Bu çalışmada da vardiyalı çalışma süresinin artması ile BKİ değerlerinde artış

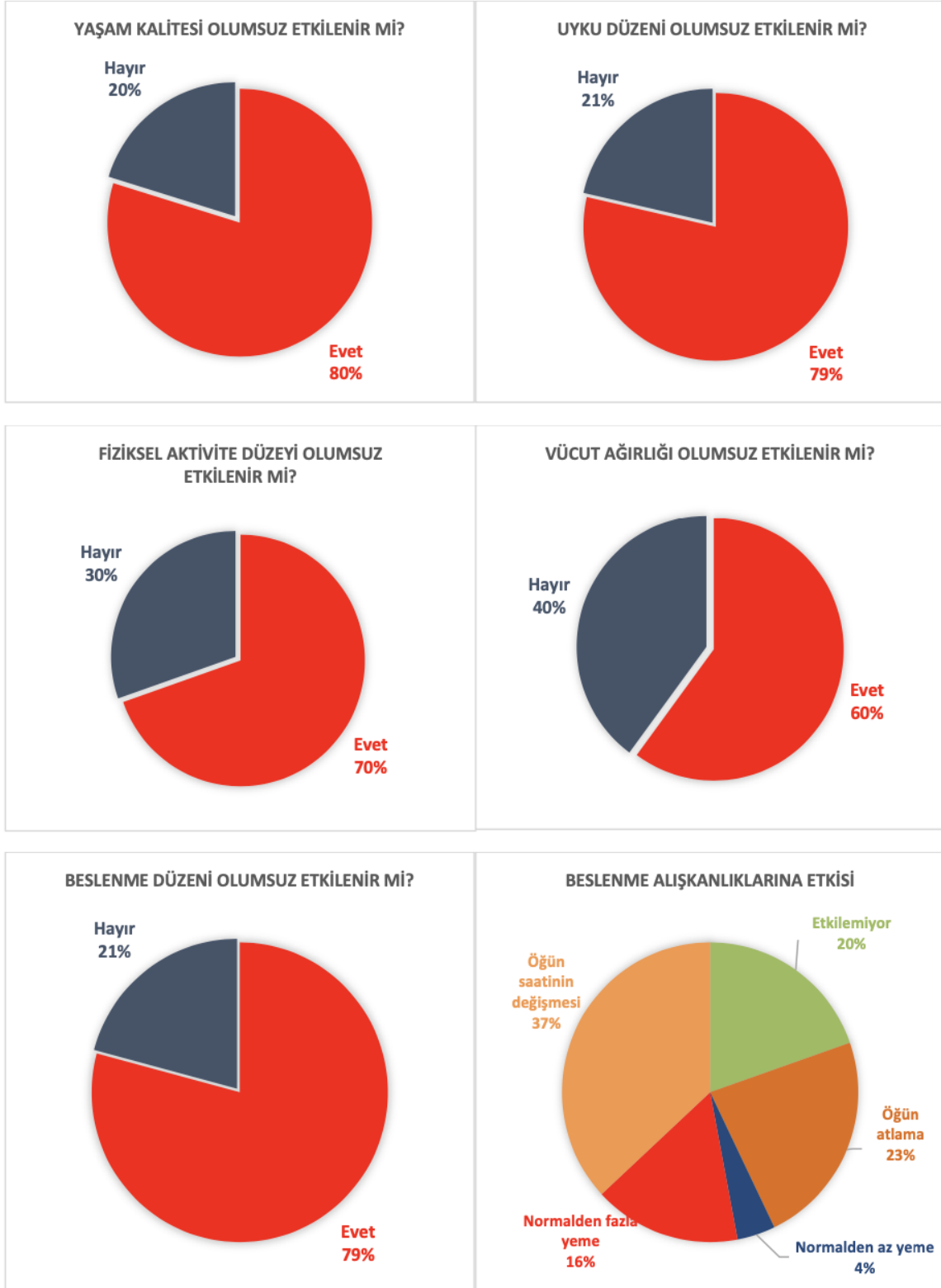
olduğu gözlenmiştir. Ayrıca gece vardiyasında çalışanların bisküvi/kraker gibi atıştırma sıklıkla tercih ettiği ve öğün tüketimlerinin düzensiz olduğu görülmüştür. Bireylerin sağlıksız besinleri sıklıkla tercih etmeleri ile obezite riskinde ve buna bağlı olarak da birçok

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

kronik hastalık riskinde de artış olduğu bilinmektedir. Bu nedenle vardiyalı sistem ile çalışan bireylerin beslenme alışkanlıklarını olumlu yönde değiştirebilmesi için bu sistemin uygulandığı iş yerlerinde sağlıklı besin alternatiflerinin bulunduğu kafeteryalar ve/veya yemekhanelerin gece vardiyası için de aktif bir şekilde hizmet vermesi gerekliliğinin önemli olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda vardiyalı çalışanların düzenli öğün tüketimlerini desteklemek için mola saatleri planlamasının iyileştirici bir uygulama olabilir. Ayrıca bu sistem ile çalışanların sağlıklı beslenme konusunda bilgi düzeylerinin artırılması için kurumlar arası iş birliği teşvik edilerek beslenme eğitimleri ve diyet danışmanlığı gibi hizmetleri kapsayan protokoller uygulanabilir.

Vardiyalı sistem ile çalışanların beslenme davranışlarının iyileşmesi, beslenme ile ilintili kronik hastalık riskinin azalması ve bu hastalıklardan kaynaklı mali yük ve iş gücü yükünün azaltılmasına katkı sağlama potansiyeline sahiptir. Sağlıklı beslenmenin iyileştirici etkisi ile ruh halinde iyileşme ve beraberinde yaşam kalitesinde de artış görülebilir. Sonuç olarak mevcut çalışma çıktılarının, vardiyalı çalışma sisteminde görev yapan kişilerin sağlığının korunması veya iyileştirmesi adına ilgili alanda çalışanlara ve ilgili kurumlara fayda sağlayabileceği öngörülmektedir.

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme



Şekil 1. Vardiyalı çalışma sisteminin etkilediği davranışlar (n=168)

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

Kaynaklar

- Alicja Kucharska, Beata Sińska, Grażyna Dykowska, & Zofia Sienkiewicz. (2018). Wpływ systemu zmianowego pracy pielęgniarek na ich sposób odżywiania i aktywność fizyczną. *Zdrowie Publiczne i Zarządzanie* 16(2): 105-111.
- Anonim. (2006). Ceza İnfaz Kurumlarının Yönetimi ile Ceza ve Güvenlik Tedbirlerinin İnfazı Hakkında Tüzük.
- Azmi, N. A. S. M., Juliana, N., Teng, N. I. M. F., Azmani, S., Das, S., Effendy, N. (2020). Consequences of Circadian Disruption in Shift Workers on Chrononutrition and their Psychosocial Well-Being. *International journal of environmental research and public health* 17(6).
- Banks, S., Dorrian, J., Grant, C., Coates, A. (2015). Circadian Misalignment and Metabolic Consequences: Shiftwork and Altered Meal Times. *Modulation of Sleep by Obesity, Diabetes, Age, and Diet* 155-164.
- Boivin, D. B., Boudreau, P. (2014). Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms. *Pathologie Biologie* 62(5): 292-301.
- Bonham, M. P., Bonnell, E. K., Huggins, C. E. (2016). Energy intake of shift workers compared to fixed day workers: A systematic review and meta-analysis. *Chronobiology international* 33(8): 1086-1100.
- Books, C., Coody, L. C., Kauffman, R., Abraham, S. (2020). Night Shift Work and Its Health Effects on Nurses. *The health care manager* 39(3): 122-127.
- Canuto, R., Garcez, A., Spritzer, P. M., Olinto, M. T. A. (2021). Associations of perceived stress and salivary cortisol with the snack and fast-food dietary pattern in women shift workers. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 24(6): 763-771.
- Cayanan, E. A., Eyre, N. A. B., Lao, V., Comas, M., Hoyos, C. M., Marshall, N. S., Phillips, C. L., Shiao, J. S. C., Guo, Y. L. L., Gordon, C. J. (2019). Is 24-hour energy intake greater during night shift compared to non-night shift patterns? A systematic review. *Chronobiology International* 36(12): 1599-1612.
- Centofanti, S., Dorrian, J., Hilditch, C., Grant, C., Coates, A., Banks, S. (2017). Eating on nightshift: A big vs small snack impairs glucose response to breakfast. *Neurobiology of sleep and circadian rhythms*, 4: 44-48.
- Chen, Y., Lauren, S., Chang, B. P., Shechter, A. (2018). Objective Food Intake in Night and Day Shift Workers: A Laboratory Study. *Clocks & Sleep* 1(1): 42-49.
- Çakmak, G., Kızıl, M. (2018). Vardiyalı Çalışan İşçilerde Beslenme Durumu, Uyku Kalitesi ve Metabolik Sendrom Arasındaki İlişki. *Beslenme ve Diyet Dergisi* 46(3): 266-275.
- Dashti, H. S., Scheer, F. A. J. L., Saxena, R., Garaulet, M. (2019). Timing of Food Intake: Identifying Contributing Factors to Design Effective Interventions. *Advances in nutrition* 10(4): 606-620.
- Dorrian, J., Heath, G., Sargent, C., Banks, S., Coates, A. (2017). Alcohol use in shiftworkers. *Accident Analysis & Prevention* 99: 395-400.
- European Foundation for the Improvement of Living and Working Conditions. (2019). *Working conditions in a global perspective*. <https://www.eurofound.europa.eu/en/publications/2019/working-conditions-global-perspective>.
- Fernandes, J. da C., Portela, L. F., Rotenberg, L., Griep, R. H. (2013). Working hours and health behaviour among nurses at public

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

- hospitals. *Revista latino-americana de enfermagem* 21(5): 1104-1111.
- Gifkins, J., Johnston, A., Loudoun, R., Troth, A. (2020). Fatigue and recovery in shiftworking nurses: A scoping literature review. *International Journal of Nursing Studies* 112.
- Gupta, C. C., Coates, A. M., Dorrian, J., Banks, S. (2019). The factors influencing the eating behaviour of shiftworkers: what, when, where and why. *Industrial Health* 57(4): 419-453.
- Haus, E., Smolensky, M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer causes & control: CCC* 17(4): 489-500.
- Heath, G., Dorrian, J., Coates, A. (2019). Associations between shift type, sleep, mood, and diet in a group of shift working nurses. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 45(4): 402-412.
- Heath, G., Roach, G. D., Dorrian, J., Ferguson, S. A., Darwent, D., Sargent, C. (2012). The effect of sleep restriction on snacking behaviour during a week of simulated shiftwork. *Accident Analysis & Prevention*, 45(SUPPL.): 62-67.
- International Agency for Research on Cancer. (2020). *IARC Working Group on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. Night Shift Work*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK568199/#a006.sec1.2>
- Kahleova, H., Lloren, J. I., Mashchak, A., Hill, M., Fraser, G. E. (2017). Meal Frequency and Timing Are Associated with Changes in Body Mass Index in Adventist Health Study 2. *The Journal of nutrition* 147(9): 1722-1728.
- Kalmbach, D. A., Anderson, J. R., Drake, C. L. (2018). The impact of stress on sleep: Pathogenic sleep reactivity as a vulnerability to insomnia and circadian disorders. *Journal of sleep research* 27(6).
- Khorasaniha, R., Siassi, F., Khajehnasiri, F., Qorbani, M., Sotoudeh, G. (2020). Dietary patterns in relation to inflammation in shift workers. *BMJ military health* 166(4): 221-226.
- Kosmadopoulos, A., Kervezee, L., Boudreau, P., Gonzales-Aste, F., Vujovic, N., Scheer, F. A. J. L., Boivin, D. B. (2020). Effects of Shift Work on the Eating Behavior of Police Officers on Patrol. *Nutrients* 12(4), 999.
- Lauren, S., Chen, Y., Friel, C., Chang, B. P., Shechter, A. (2020). Free-Living Sleep, Food Intake, and Physical Activity in Night and Morning Shift Workers. *Journal of the American College of Nutrition*, 39(5), 450-456.
- Lemke, M. K., Apostolopoulos, Y., Hege, A., Sönmez, S., Wideman Lemke, L. M. (2016). *Understanding the role of sleep quality and sleep duration in commercial driving safety under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivatives 4.0 License (CC BY-NC-ND)*; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>.
- Łokieć, K., Górska-Ciebiada, M. (2020). Nutritional behaviours of shift workers. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 26(3): 213-220.
- Lopez-Minguez, J., Saxena, R., Bandín, C., Scheer, F. A., Garaulet, M. (2018). Late dinner impairs glucose tolerance in MTNR1B risk allele carriers: A randomized, cross-over study. *Clinical Nutrition* 37(4): 1133-1140.
- Lowden, A., Moreno, C., Holmbäck, U., Lennernäs, M., Tucker, P. (2010). Eating and shift work-effects on habits,

Vardiyalı Çalışma Sistemi ve Beslenme Alışkanlıkları: Tekirdağ T Tipi Kapalı Ceza İnfaz Kurumunda Çalışanlar Üzerinde Bir Değerlendirme

- metabolism and performance. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 36(2): 150-162.
- Mason, I. C., Qian, J., Adler, G. K., Scheer, F. A. J. L. (2020). Impact of circadian disruption on glucose metabolism: implications for type 2 diabetes. *Diabetologia*, 63(3): 462-472.
- Mota, M. C., Waterhouse, J., De-Souza, D. A., Rossato, L. T., Silva, C. M., Araújo, M. B. J., Tufik, S., De Mello, M. T., Crispim, C. A. (2014). Sleep pattern is associated with adipokine levels and nutritional markers in resident physicians. *Chronobiology International* 31(10): 1130-1138.
- Newby, P. K., Tucker, K. L. (2004). Empirically derived eating patterns using factor or cluster analysis: a review. *Nutrition reviews* 62(5): 177-203.
- Peplonska, B., Bukowska, A., Sobala, W. (2015). Association of Rotating Night Shift Work with BMI and Abdominal Obesity among Nurses and Midwives. *PloS one* 10(7).
- Peplowska, B., Nowak, P., Trafalska, E. (2019). The association between night shift work and nutrition patterns among nurses: a literature review. *Medycyna Pracy. Workers' Health and Safety* 70(3): 363-376.
- Reid, K. J., Baron, K. G., Zee, P. C. (2014). Meal timing influences daily caloric intake in healthy adults. *Nutrition research* 34(11): 930.
- Sanchez, C., Killgore, W., Gehrels, J., Alfonso-Miller, P., Grandner, M. (2018). Nighttime Snacking: Prevalence And Associations With Poor Sleep, Health, Obesity, And Diabetes. *Sleep* 41(suppl_1): A49-A50.
- Shaw, E., Dorrian, J., Coates, A. M., Leung, G. K. W., Davis, R., Rosbotham, E., Warnock, R., Huggins, C. E., Bonham, M. P. (2019). Temporal pattern of eating in night shift workers. *Chronobiology International* 36(12): 1613-1625.
- Smith, P., Fritschi, L., Reid, A., Mustard, C. (2013). The relationship between shift work and body mass index among Canadian nurses. *Applied Nursing Research* 26(1), 24-31.
- Wang, X. S., Armstrong, M. E. G., Cairns, B. J., Key, T. J., Travis, R. C. (2011). Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occupational medicine* 61(2), 78-89.
- WHO. (2010). *A healthy lifestyle-WHO recommendations*.
<https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/a-healthy-lifestyle--who-recommendations>
- Wolska, A., Stasiewicz, B., Kaźmierczak-Siedlecka, K., Ziętek, M., Solek-Pastuszka, J., Drozd, A., Palma, J., Stachowska, E. (2022). Unhealthy Food Choices among Healthcare Shift Workers: A Cross-Sectional Study. *Nutrients* 14(20).