

# GIDA

*THE JOURNAL OF FOOD*



E-ISSN 1309 - 6273, ISSN 1300 - 3070

CİLT / VOLUME : 49

SAYI / NUMBER : 5

YIL / YEAR : 2024

**GIDA TEKNOLOJİSİ DERNEĞİ YAYINI**

*PUBLISHED BY THE ASSOCIATION OF  
FOOD TECHNOLOGY IN TURKEY*

**Sahibi / Owner**

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

Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN

Yönetim Kurulu Başkanı / President of the Association

**Baş Editör / Editor-in Chief**

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

**Editörler / Editors**

AVCI, Ayşe; *Sakarya University, Turkey*

AYDIN, Furkan; *Aksaray University, Turkey*

ÇOLAKOĞLU, A. Sinan; *Kabramanmaraş Sütçü İmam University, Turkey*

DEMİRKESEN MERT; İlkem, *Ministry of Agriculture and Forestry, Turkey*

DEMİROK SONCU, Eda; *Ankara University, Turkey*

ERİNÇ, Hakan; *Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey*

EYİLER, Esen; *Akdeniz University, Turkey*

KULEAŞAN, Şükran; *Mehmet Akif University, Turkey*

TORUN, Mehmet; *Akdeniz University, Turkey*

YILMAZ, Merve Silanur; *Bilis Eren University, Turkey*

**Yönetim Yeri**

**Adres / Address**

Büyükelçi Sokak No: 18/1 Kavaklıdere/Ankara Turkey

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

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

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

**Yayın Türü:** Yaygın süreli ve hakemli

**Hazırlayan / Prepared**

Sim Ajans

19. Sokak No: 47/1 Emek / Ankara

Tel : (+90) 312 925 25 95

e-mail: simajans@simajans.com

**Yayın Tarihi / Publication Date**

15 10 2024

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Akköse, Ahmet; *Atatürk University, Turkey*

Ank, Gökşen G.; *Balıkesir University, Turkey*

Atalar, İlyas; *Bolu Abant İzzet Baysal University, Turkey*

Baysal, A. Handan; *İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Turkey*

Bezirtzoglou, Eugenia; *Democritus University of Thrace, Greece*

Bozkır, Hamza; *Sakarya Uygulamalı Bilimler University, Turkey*

Çilak, Gizem Ö.; *Hitit University, Turkey*

Draughon, Ann *Tennessee University, USA*

El Soda, *Morsi University of Alexandria, Egypt*

Erbay, Zafer; *Adana Bilim ve Teknik University, Turkey*

Evren, Mustafa; *Ondokuz Mayıs University, Turkey*

Fogliano, Vincenzo *University of Napoli Federico II, Italy*

Gerçekaslan, K. Emre; *Neşehir Hacı Bektaş Veli University, Turkey*

Ghosh, Bikash C. *National Dairy Research Institute, India*

Gollop, Natan *The Volcani Center, ARO, Israel*

Griffiths, Mansel *University of Guelph, Canada*

Güneşer, Onur; *Uşak University, Turkey*

Güven, Esra Ç.; *İstanbul Teknik University, Turkey*

Ho, Chi-Tang *The State University of New Jersey, USA*

Hoşoğlu, Müge İ.; *Gebze Teknik University, Turkey*

Hüner, İrem D.; *Trakya University, Turkey*

Kahraman, Kevser; *Abdullah Gül University, Turkey*

Karaca, Hakan; *Pamukkale University, Turkey*

Koçan, Deniz; *Aksaray University, Turkey*

Konuşkan, Dilşat B.; *Mustafa Kemal University, Turkey*

Kuleaşan, Hakan; *Süleyman Demirel University, Turkey*

Meral, Raciye; *Yüzüncü Yıl University, Turkey*

Mete, Aylin A.; *Mersin University, Turkey*

Morales, Francisco J. *CSIC Instituto del Fr o, Spain*

Mujtaba, Mustafa G. *Florida Gulf Coast University, USA*

Mutlu, Türkan K.; *Çukurova University, Turkey*

Öztürk, Fatma; *Kâtip Çelebi University, Turkey*

Paalme, Toomas *Tallinn University of Technology, Estonia*

Parlar, Harun *Technical University of Munich, Germany*

Raspor, Peter *University of Primorska, Slovenia*

Rezessy-Szabo, Judit M. *Corvinus University of Budapest, Hungary*

Sarı, Ferda; *Cumburiyet University, Turkey*

Şengün, İlkin Y.; *Ege University, Turkey*

Soyer, Yeşim; *Orta Doğu Teknik University, Turkey*

Toğay, Sine Ö.; *Bursa Uludağ University, Turkey*

Toker, Ömer S.; *Yıldız Teknik University, Turkey*

Velioglu, Murat; *Namık Kemal University, Turkey*

Yemiş, Gökçe P.; *Sakarya University, Turkey*

Yolaçaner, Elif; *Hacettepe University, Turkey*

Yorulmaz, Aslı; *Adnan Menderes University, Turkey*

Zorba, Murat; *Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey*

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

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

# İçindekiler / Content GIDA (2024)49(5)

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Bayaçlı, G., Patır, İ., Karkar, B., Şabin, S. (2024). Optimization of the synergistic antioxidant effect of selected phenolic compounds (gallic acid, rosmarinic acid and caffeic acid) and investigation of their ability to prevent formation of DNA base damage / Seçilmiş fenolik bileşiklerin (gallik asit, rosmarinik asit ve kafeik asit) sinerjistik antioksidan etkisinin optimizasyonu ve DNA baz hasarı oluşumunu önleme yeteneklerinin araştırılması .....777-790
- Eminoğlu, G. (2024). The impact of starter cultures on quark type cheese production / Starter kültürlerin quark tipi peynir üretimine etkisi .....791-804
- Huseynov, S., Tarlak, F. (2024). Developing menu planning software using optimization and artificial intelligence algorithm / Optimizasyon ve yapay zekâ algoritmaları kullanarak menü planlama yazılımı geliştirilmesi .....833-846
- Ünal, N., Süslü, A., Külcü, R., Dincer, C., Yavuzlar, İmurgü E. E., Ertekin, C. (2024). Convective drying of chokeberry cv. "viking" and modeling of drying kinetics / Aronyanın konvektif kurutulması ve kurutma kinetiğinin modellemesi .....847-862
- Karabulut, G. (2024). Techno-functional properties of chickpea protein isolate-treated acidic and basic pH-cycling / Asidik ve bazik pH-değiştirme uygulanmış nohut proteinlerinin teknofonksiyonel özellikleri .....879-890
- Rayman Ergün, A. (2024). Investigation of conventional and microwave combined roasting effect on the physicochemical, textural and sensory properties of sunflower seed / Ayçekirdeğinin fizikokimyasal, tekstürel ve duyuşal özellikleri üzerine konvansiyonel ve mikrodalga kombine kavurma etkisinin incelenmesi .....891-902
- Poyraz Ekinci, F., Kökyar, N., Sener, D. (2024) Investigation of the effect of enzyme application on the structure of wafers in the food industry / Enzim uygulamasının gıda endüstrisinde gofretlerin yapısı üzerindeki etkisinin incelenmesi .....946-959
- Yasar, D., Kose, S. (2024). The effect of packaging methods and storage temperatures on the antioxidant and antimicrobial activities of Malatya cheese / Ambalajlama yöntemleri ve depolama sıcaklıklarının Malatya peynirinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerine etkisi .....960-967

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Bacı Torun, F. (2024). Nar suyunun aljinat kürecikleri ile enkapsülasyonu: İşlem koşullarının optimizasyonu / Encapsulation of pomegranate juice using alginate beads: Optimization of processing conditions .....805-819
- Özkar, A. (2024). Afyonkarahisar ilinde yerel marketlerden toplanan Corylus avellana (fındık) örneklerinden fungus izolasyonu, aflatoxin ve okratoksin A miktarının belirlenmesi / Fungus isolation, determination of aflatoxin and ochratoxin A from Corylus avellana (hazelnut) samples collected from local markets in Afyonkarahisar province .....820-832
- Karakuş, M. Ş. (2024). Bakla proteini: Mikrodalga destekli özütleme koşullarının optimizasyonu ve karakteristik özelliklerinin peyniraltı suyu proteini ile karşılaştırılması/ Faba bean protein: Optimization of microwave-assisted extraction conditions and comparison of its characteristics with whey protein .....863-878
- Kaynarca, G. B. (2024). Bezelye proteini ve spirulina ilavesinin ikili hidrojel formlarının reolojik özellikleri üzerine etkisi / The effect of pea protein and spirulina addition on the rheological properties of binary hydrogel forms .....903-919
- Karaoğlu H. A. (2024). Yeşil sarımsak (*Allium sativum* L.) yapraklarında bulunan fenolik ve antioksidan maddelerin ekstraksiyon koşullarının yüzey yanıt yöntemi ile optimizasyonu / Optimization of phenolic and antioxidant compounds extraction conditions in green garlic (*Allium sativum* L.) leaves by surface response methodology .....920-933
- Kutlu, N., Hacıbektaşoğlu, H. (2024). Derin ötektik çözücülerin portakal kabuğundan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonuna etkisi / Effect of deep eutectic solvents on extraction of bioactive compounds from orange peel .....934-945
- Akan, E., Yıldız Akgül, F., Karaman, A. D. (2024). Aydın ilinde satılan çörek otlı Çökelek peynirlerinin genel bileşimi, yağ asidi ve uçucu bileşen kompozisyonu / General composition, fatty acid and volatile component composition of Çökelek cheese with black cumin sold in Aydın province .....968-980
- Demirbaş Yıldız, S., Gülsünoğlu Konuşkan, Z. (2024). Elma kabuğuyla beslenen *Tenebrio molitor* larvalarının fizikokimyasal özellikleri ve larval fermentasyonun elma kabuğunun fenolik profiline etkisi / Physicochemical properties of *Tenebrio molitor* larvae feeding on apple peel and the effect of larval fermentation on the phenolic profile of apple peel .....981-995



**OPTIMIZATION OF THE SYNERGISTIC ANTIOXIDANT EFFECT OF  
SELECTED PHENOLIC COMPOUNDS (GALLIC ACID, ROSMARINIC ACID  
and CAFFEIC ACID) AND INVESTIGATION OF THEIR ABILITY TO  
PREVENT FORMATION OF DNA BASE DAMAGE**

**Gizem BAYAÇLI<sup>1,2</sup>, İlkyaz PATIR<sup>1</sup>, Büşra KARKAR<sup>1</sup>, Saliha ŞAHİN<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> University of Bursa Uludağ, Faculty of Science and Arts, Department of Chemistry, Bursa, Türkiye

<sup>2</sup> Karesi Polyester and Petrochemical Industry Co. /R&D Department, Bursa, Türkiye

Received Geliş: 09.01.2024; Accepted/Kabul: 05.08.2024; Published online/Online baskı: 17.08.2024

*Bayaçlı, G., Patır, İ., Karkar, B., Şahin, S. (2024). Optimization of the synergistic antioxidant effect of selected phenolic compounds (gallic acid, rosmarinic acid and caffeic acid) and investigation of their ability to prevent formation of DNA base damage. GIDA (2024) 49 (5) 777-790 doi: 10.15237/gida.GD24012*

Bayaçlı, G., Patır, İ., Karkar, B., Şahin, S. (2024). Seçilmiş fenolik bileşiklerin (gallik asit, rosmarinik asit ve kafeik asit) sinerjistik antioksidan etkisinin optimizasyonu ve DNA baz hasarı oluşumunu önleme yeteneklerinin araştırılması. GIDA (2024) 49 (5) 777-790 doi: 10.15237/gida.GD24012

**ABSTRACT**

Considering the areas of use of phenolic compounds, it is important to determine the concentrations at which they show synergistic and antagonistic interactions for their integration into various systems and their correct use. In this study, the synergistic interaction concentration of rosmarinic acid, gallic acid, and caffeic acid was determined by Folin–Ciocalteu and FRAP methods. The central composite design–response surface methodology was used to determine the optimum concentration for synergistic interaction. As a result of the optimization, caffeic acid, rosmarinic acid, and gallic acid showed synergistic interaction at 7.87 µM, 6.75 µM and 9.42 µM concentrations for Folin–Ciocalteu method; 8.03 µM, 9.34 µM and 6.00 µM concentration for FRAP method respectively. The capacity of phenolic compounds to prevent the formation of DNA base damage products was evaluated by GC–MS/MS. As a result, the synergistic concentration of three phenolics reduces the DNA damage products at 37.17% (FOLIN) and 40.17% (FRAP).

**Keywords:** Antioxidant, DNA oxidation, optimization, phenolic, synergistic effect

**SEÇİLMİŞ FENOLİK BİLEŞİKLERİN (GALLİK ASİT, ROSMARİNİK ASİT ve  
KAFEİK ASİT) SİNERJİSTİK ANTIOKSIDAN ETKİSİNİN OPTİMİZASYONU  
VE DNA BAZ HASARI OLUŞUMUNU ÖNLEME YETENEKLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**ÖZ**

Fenolik bileşiklerin kullanım alanları düşünüldüğünde, sinerjik ve antagonistik etkileşim gösterdikleri konsantrasyonların belirlenmesi, çeşitli sistemlere entegrasyonları ve doğru kullanımları için

\* Corresponding author/ Sorumlu yazar

✉: salihabilgi@uludag.edu.tr

☎: (+90) 224 294 1899

Gizem Bayaçlı; ORCID no: 0000-0001-9676-5531

İlkyaz Patır; ORCID no: 0000-0002-3503-2550

Büşra Karkar; ORCID no: 0000-0001-6547-5558

Saliha Şahin; ORCID no: 0000-0003-2887-5688

önemlidir. Bu çalışmada, rosmarinik asit, gallik asit ve kafeik asidin sinerjik etkileşim konsantrasyonu Folin–Ciocalteu ve FRAP yöntemleri ile belirlenmiştir. Sinerjik etkileşim için optimum konsantrasyonu belirlemek üzere merkezi kompozit dizayn–yanıt yüzeyi metodolojisi kullanılmıştır. Optimizasyon sonucunda kafeik asit, rosmarinik asit ve gallik asit Folin–Ciocalteu yöntemi için sırasıyla 7.87  $\mu\text{M}$ , 6.75  $\mu\text{M}$  ve 9.42  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında; FRAP yöntemi için 8.03  $\mu\text{M}$ , 9,34  $\mu\text{M}$  ve 6.00  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında sinerjik etkileşim göstermiştir. Fenolik bileşiklerin DNA baz hasarı ürünlerinin oluşumunu önleme kapasitesi GC–MS/MS ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, üç fenoliğın sinerjik konsantrasyonu DNA hasar ürünlerini %37.17 (FOLIN) ve %40.17 (FRAP) oranında azaltmaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan, DNA oksidasyonu, optimizasyon, fenolik, sinerjik etki

## INTRODUCTION

Free radicals are self-existing, reactive, unstable, and short-lived molecules containing unpaired electrons (Dreher and Junod, 1996). Free radicals can be formed as a by-product of the aerobic organism or by various external effects such as UV radiation, harmful chemicals, air pollution, stress, smoke, drug toxications and metal ions such as copper, nickel, cadmium, iron, mercury, chromium (Buonocore et al., 2010; Ceylan et al., 2018; Kaur and Kapoor, 2001; Munteanu and Apetrei, 2021). The majority of free radicals in living organisms are formed due to partial reduction of the oxygen molecule and are entitled reactive oxygen species (ROS). ROS generally include hydroxyl (\*OH), superoxide ( $\text{O}_2^-$ ), hydroperoxyl ( $\text{HOO}^*$ ), peroxy ( $\text{ROO}^*$ ), and alkoxy ( $\text{RO}^*$ ) radicals (Halliwell, 2006; Jiang and Rusling, 2019; Andrés et al., 2023). The increase in cellular ROS levels leads to oxidative stress, damaging cellular elements such as DNA, protein, and ribosome (Dizdaroglu et al., 2002; Srinivas et al., 2019). The damage to DNA can cause cell division, cancer, ageing, inflammation, and degenerative diseases such as Alzheimer, Parkinson, cardiovascular disease, and atherosclerosis (Aybastier and Demir, 2021; Seal et al., 2020).

Antioxidants prevent oxidation caused by ROS and can scavenge free radicals. Thanks to these properties, antioxidants play a significant role in avoiding various ailments caused by ROS (Tsao, 2010; Ye et al., 2023). Phenolic compounds are considered potent antioxidants, and they have been shown to inhibit cellular oxidative damage. Chlorogenic acid, resveratrol, and caffeic acid, etc., are examples of these compounds and have been reported to reduce cellular ROS levels by

effectively reducing DNA damage. In addition to the radical scavenging properties, they have anti-microbial, anti-fungal, anti-mutagenic, and anti-carcinogenic activity and these effects are the result of antioxidant activity (Ferguson, 2001).

Polyphenols are abundant in fruits, vegetables, and some traditional herbs (Zhang et al., 2018). The combinations of phenolic compounds were hypothesized to have more significant antioxidant activity than expected based on their individual effects (Saucier and Waterhouse, 1999). A synergistic effect is called when two or more compounds are greater than the sum of their individual effects. If there are two or more substances together, when they are less than the sum of the individual effects of these substances, then the antagonistic effect is mentioned. Today, a mixture or combination of various drugs is used for the treatment of many diseases at the same time. For this reason, it is important to investigate the synergistic and antagonistic effects of chemical substances. Phenolic compounds show synergistic, additive, and antagonistic effects when mixed in pairs (Tsao, 2015). The synergistic effects of antioxidant polyphenols are not only a defense mechanism against oxidative stress in biological systems but also facilitate application in food systems (Wang et al., 2011). For example, Mohamed, 2011 reported that a mixture of rosemary and green tea extract had a synergistic effect against oxidation of meats. Irwandi et al., 2000 studied the oxidative behavior of rosemary, sage, and citric acid combinations in linoleic acid and palm olein systems and reported significant synergistic effects between them. Similarly, De Guzman et al., 2009 found that the combination of tetrabutyl hydroquinone and butylated hydroxyanisole had synergistic antioxidant

activity on the stability of soy bean oil. By determining synergistic concentrations, suitable systems have been developed for food preservation.

In this study, three of the polyphenols commonly found in foods, rosmarinic acid (RA), gallic acid (GA) and caffeic acid (CA) were selected and their synergistic antioxidant concentration was investigated and the effect of this concentration on DNA oxidation was examined. For this goal, central composite design-response surface methodology (RSM-CCD) was utilized to evaluate the synergistic antioxidant concentration of rosmarinic acid, gallic acid, and caffeic acid. Then, the effect of phenolic compound concentrations with optimum synergistic antioxidant values on DNA oxidation inhibition ability was expressed.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

RA, GA, CA, Folin-Ciocalteu reagent, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine, and Trolox in HPLC-Grade were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO., USA). The 5,6-dihydrothymine (56DHT), 5-hydroxy-5-methylhydantoin (5H5MH), 5-hydroxy hydantoin (5HH), 5-hydroxycytosine (5HC), 2-hydroxyadenin (2HA) and 2,8-dihydroxyadenine (28DHA) were purchased Toronto Research Chemicals (Canada). The 5,6-dihydrouracil (56DHU), 8-hydroxy-2-deoxyguanine (8OHG), and DNA from the calf thymus were purchased Sigma (USA). The 5-formyluracil (5FU) was purchased IS Chemical Technology in China. The 5-hydroxyuracil (5HU), thymine glycol (TG), 5-(hydroxymethyl) cytosine (5HMC), 8-hydroxyadenine (8HA), and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FG) were purchased the National Institute of Standards and Technology (USA). The 5-(hydroxymethyl) uracil (5HMU) and alloxane (Alx) were purchased Titan Biotech (Delhi, India). The 4,6-diamino-5-nitropyrimidine (46D5NP) was purchased Aldrich Chemical (USA). The 4,6-diamino-5-(formylamino) pyrimidine (46D5FP) was

purchased from Santa Cruz Biotechnology (USA).

## Methods

### Experimental design

Chemometric methods were used to determine the optimum concentration at which GA, RA, and CA solutions showed synergistic effects. In order to optimize the concentrations of synergistic effects shown by antioxidants, an RSM-CCD consisting of 20 experiments with five levels and three parameters was designed. Total phenolic content (TPC) and total antioxidant capacity (TAC) analyses were selected in response to RSM-CCD. Design Expert 7.0.0 (Stat-Ease Inc. USA) was employed for ANOVA analysis using TPC (Folin-Ciocalteu) and TAC (FRAP) measurement results for 20 experiments, considering the levels given in Table 1.

Table 1. Independent factors and their levels used for central composite design

Independent factor	Level				
	-1.732	-1	0	1	1.732
CA ( $\mu\text{M}$ )	2.54	4	6	8	9.46
RA ( $\mu\text{M}$ )	2.54	4	6	8	9.46
GA ( $\mu\text{M}$ )	2.54	4	6	8	9.46

CA, Caffeic acid; RA, Rosmarinic acid; GA, Gallic acid

The number of experiments (N) is estimated using the following Equation 1.

$$N = 2k + 2k + x_0 \quad (1)$$

The coded values of the CCD are given in Table 2, and the predicted responses were calculated using a second-order polynomial Equation 2.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

### Sample preparation for experimental design.

The GA, CA, and RA solutions (100  $\mu\text{M}$ ) prepared with methanol and solutions stored at 4°C. The ternary combination to be used in the study was prepared by dilution of 100  $\mu\text{M}$  stock solution according to the concentrations given in Table 1. The solutions were then analysed by

mixing at concentrations corresponding to the coded values given in Table 2.

Table 2. Central composite design of factors with coded values

Treatment	Factors		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$
	CA ( $\mu\text{M}$ )	RA ( $\mu\text{M}$ )	GA ( $\mu\text{M}$ )
1	4	4	4
2	8	4	4
3	4	8	4
4	8	8	4
5	4	4	8
6	8	4	8
7	4	8	8
8	8	8	8
9	2.54	4	4
10	9.46	4	4
11	6	2.54	4
12	6	9.46	4
13	6	6	2.54
14	6	6	9.46
15	6	6	6
16	6	6	6
17	6	6	6
18	6	6	6
19	6	6	6
20	6	6	6

CA, Caffeic acid; RA, Rosmarinic acid; GA, Gallic acid

#### **Total phenolic content (TPC) analysis.**

The TPC was measured by the Folin–Ciocalteu method. Briefly, x mL of sample or standard, 2-x mL of distilled water, 2.5 mL of Lowry C solution (50:1 ratio of Lowry A: Lowry B, Lowry A; 0.4% NaOH and 0.2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and Lowry B; 0.5 g of  $\text{CuSO}_4$  and 1 g of  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) and 0.25 mL of Folin–Ciocalteu reagent were mixed (total volume of 4.75 mL) and then incubated 30 min in the dark. The sample's absorbance was measured by a UV–Vis Spectrophotometer (at 750 nm) (Varian Cary 50 Conc). The TPC of GA, RA and CA represent as mg gallic acid equivalent (GAE) (Karkar and Şahin, 2022).

#### **Total antioxidant capacity (TAC) analysis.**

FRAP method was used for TAC determination. Trolox solution prepared at increasing concentrations was used as the standard material for the calibration graph. In this method, 10 mM TPTZ solution (40 mM HCl, 20 mM  $\text{FeCl}_3$  in distilled water) and pH 3.6 acetate buffer were prepared. The x mL of sample or standard and 3-x mL of FRAP reagent (acetate buffer:  $\text{FeCl}_3$ : TPTZ, 10:1:1) were mixed (total volume 3 mL) and then incubated in the dark for 30 min. The sample's absorbance was measured by a UV–Vis spectrophotometer (at 593 nm). The TAC of GA, CA, and RA represent mg Trolox equivalent (TE) (Şahin and Karkar, 2019).

#### **GC-MS/MS analysis of optimum synergistic concentration of GA, CA, and RA.**

The ability of the combined synergistic antioxidant activity of the three phenolic compounds to prevent DNA base oxidation was investigated by determining the concentration of DNA base damage products using GC–MS/MS. The DNA base damage products were delicately examined by SRM mode based on product ions and measured quantitatively. The oxidatively damaged DNA products were measured in control (DNA with the Fenton reaction) and test samples (gallic acid, caffeic acid, and rosmarinic acid with the DNA and Fenton reaction). The DNA from the calf thymus (5 mg in 10 mL of ultra-pure water) was incubated at 4°C for 12 h, and the DNA solution was diluted at a 1:10 ratio and incubated at 4°C for 12 h. The concentration was determined by UV–Vis spectrophotometer at 260 nm and was calculated using Equation 3.

$$\mu\text{g DNA} = A_{260} \times 50 \quad (3)$$

The Fenton reaction generated the oxidative stress medium. The Fenton reaction agent formed 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  and 150  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  solutions. Three samples (2.5 mL) were arranged to examine the antioxidant activity of CA, GA, and RA (optimum concentration of Folin and FRAP) on DNA oxidation: (1) Fenton and DNA; (2) Fenton, DNA, CA, GA and RA concentrations of Folin; (3) Fenton, DNA, CA, GA and RA concentrations of FRAP. The samples were

incubated for 20 min at 37°C and frozen (-20°C for 18 h) and lyophilized (24 h) in a FreeZone Labconco (MO, USA) (-85°C, at a vacuum of 0.1 mbar). The samples were hydrolyzed with formic acid (1 mL, 60% v/v) (130°C for 30 min) (Şahin and Karkar, 2019).

The DNA base damage products were analyzed by GC-MS/MS (Trace 1300 GC and TSQ 8000 Evo from Thermo Scientific (USA). The column was Agilent Durabond DB-5MS (12 m × 0.20 mm, 0.33 µm), and the flow rate was 1 mL/min. GC-MS/MS was used with electron impact ionization mode. The ion source and MS transfer line temperature were selected as 250°C and 280°C, respectively. Before the analysis, samples were derivatized with BSTFA containing 1% concentration of TMCS (Dawbaa et al., 2017).

### Statistical analysis.

All experimental values were analyzed in triplicate and presented as mean value ± standard deviation (SD). According to the ANOVA results, factors with  $p < 0.05$  are considered significant, and parameters with  $p > 0.05$  are considered insignificant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Fitting of models

The synergistic effect concentrations demonstrated by the antioxidants were optimized using an RSM-CCD. The most convenient combination of variables, including GA (2.54–9.46 µM), RA (2.54–9.46 µM), and CA (2.54–9.46 µM) solution was investigated for a synergistic effect. The experimental and predicted responses were given in Table 3.

Table 3. Central composite design of factors with experimental and predicted values

Treatment	Total phenolic content (mg GAE)		Total antioxidant capacity (mg TE)	
	FOLIN		FRAP	
	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
1	22.37	25.28	28.39	30.54
2	25.29	26.36	36.40	36.93
3	20.47	21.46	31.78	31.51
4	32.61	35.74	37.29	36.07
5	23.95	23.85	32.62	33.82
6	29.40	31.44	38.40	38.66
7	29.17	31.13	41.70	41.16
8	51.79	51.91	44.36	44.19
9	20.12	18.28	34.12	32.65
10	39.41	37.21	39.30	40.80
11	23.99	22.05	40.20	37.80
12	38.58	36.48	41.00	43.42
13	32.49	29.29	28.26	27.57
14	42.90	42.06	36.72	37.43
15	27.99	29.69	27.40	27.22
16	29.17	29.69	25.84	27.22
17	28.53	29.69	26.62	27.22
18	34.00	29.69	26.54	27.22
19	29.80	29.69	27.56	27.22
20	28.66	29.69	29.37	27.22

GAE, Gallic acid equivalent; TE, Trolox equivalent



Among the 20 experiments, including five replicates, experiment 8 (CA concentration 8  $\mu\text{M}$ ; RA concentration 8  $\mu\text{M}$ ; and GA concentration 8  $\mu\text{M}$ ) had the highest TPC (51.79 mg GAE), and experiment 9 (CA concentration 2.54  $\mu\text{M}$ ; RA concentration 6  $\mu\text{M}$ ; and GA concentration 6  $\mu\text{M}$ ) the least TPC (20.12 mg GAE) were displayed. The experiment 8 (CA concentration 8  $\mu\text{M}$ ; RA concentration 8  $\mu\text{M}$ ; and GA concentration 8  $\mu\text{M}$ )

had the most significant amount of TAC (44.36 mg TE), and experiment 16 (CA concentration 6  $\mu\text{M}$ ; RA concentration 6  $\mu\text{M}$ ; and GA concentration 6  $\mu\text{M}$ ) had the smallest amount of TAC (25.84 mg TE). The model F-value (15.28 and 20.38 for Folin, and FRAP methods, respectively) was significant at a 95% confidence interval (Table 4).

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model for optimization of concentration parameters

Source	FOLIN ( $R^2 = 0.9322$ )					FRAP ( $R^2 = 0.9483$ )				
	DF	SS	MS	F value	p value	DF	SS	MS	F value	p value
Model	9	1098.21	122.02	15.28	<0.0001	9	687.11	76.35	20.38	<0.0001
Lack of fit	5	55.72	11.14	2.31	0.1900	5	29.96	5.99	4.00	0.0773
Pure error	5	24.14	4.83			5	7.50	1.50		

DF, Degree of freedom; SS, sum of squares; MS mean square

### RSM analysis of TPC

The RSM analysis in Table 4 displayed a good regression value ( $R^2=0.9322$ ) and showed the interaction between the TPC and factors of CA

concentration, RA concentration, and GA concentration. A significant quadratic polynomial equation for the TPC amount is given in Table 5.

Table 5. Second order polynomial equations and regression coefficients of the response variables ( $x_1$ , the concentration of caffeic acid;  $x_2$ , the concentration of rosmarinic acid;  $x_3$ , the concentration of gallic acid)

Responses	Second order polynomial equations
FOLIN (mg GAE)	$y = 29.69 + 5.47x_1 + 4.16x_2 + 3.69x_3 + 3.30x_1x_2 + 2.77x_2x_3 + 2.00x_3^2$
FRAP (mg TE)	$y = 27.22 + 2.35x_1 + 1.62x_2 + 2.85x_3 + 1.59x_2x_3 + 3.17x_1^2 + 4.46x_2^2 + 1.76x_3^2$

GAE, Gallic acid equivalent; TE, Trolox equivalent

The  $x_1$  (CA concentration),  $x_2$  (RA concentration),  $x_3$  (GA concentration),  $x_1x_2$ ,  $x_2x_3$ , and  $x_3^2$  factors were the most important for the TPC. However,  $x_1x_3$ ,  $x_1^2$ , and  $x_2^2$  had less effect on the TPC. The interaction between factors and TPC was demonstrated by response surface plots in Figures 1a and 1b. The TPC was increased with increasing CA concentration at the high RA concentration. The highest TPC was noticed at higher RA concentrations and higher CA concentrations. Therewithal in Figure 1b, when the GA concentration was scaled up from 2.54 to 9.46  $\mu\text{M}$ , and the RA concentration was kept high, the TPC was observed as high.

### RSM analysis of TAC

The RSM analysis of the data in Table 4 indicated that the interaction between the TAC amount and the factors was quadratic with a good regression coefficient ( $R^2=0.9483$ ). According to ANOVA analysis, the most significant factors ( $p<0.05$ ) were  $x_1$  (CA concentration),  $x_2$  (RA concentration),  $x_3$  (GA concentration),  $x_2x_3$ ,  $x_1^2$ ,  $x_2^2$ ,  $x_3^2$ , and the least effective factors were  $x_1x_2$ ,  $x_1x_3$  ( $p>0.05$ ) on the TAC capacity (Table 5). Response surface plots in Figure 1c demonstrated the interaction between factors and TAC. Figure 1c represents the effect of GA concentration, RA concentration, and their mutual interaction on the TAC. The increase in TAC was noticed with

increasing GA concentration. A decrease in the TAC was noticed with increasing RA concentration at first, but when the RA

concentration reached 6  $\mu\text{M}$  and antioxidant capacity increased.

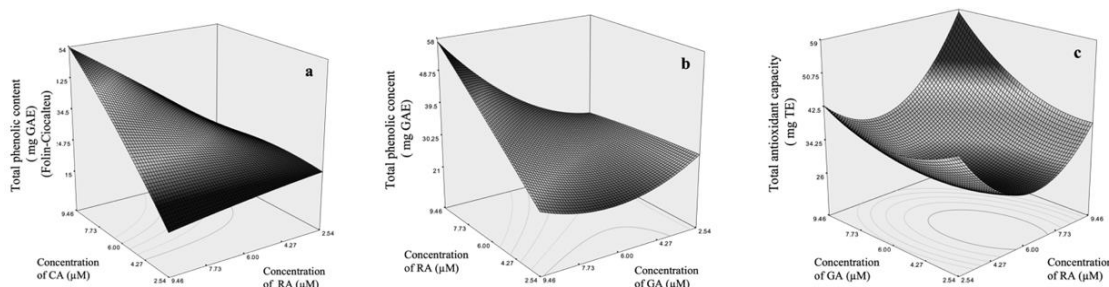


Figure 1. Response Surface Plots of synergistic effect showing the effects of a) concentration of CA and RA on the total phenolic content, b) concentration of RA and GA on the total phenolic content, c) concentration of GA and RA on the total antioxidant capacity (CA: caffeic acid, RA: rosmarinic acid, GA: gallic acid, GAE: Gallic acid equivalent, TE: Trolox equivalent).

### Optimization of the synergistic effect of antioxidant

The optimum conditions (predicted and experimental response) for synergistic effect are presented in Table 6. The concentration range of CA 6.14–8.03  $\mu\text{M}$ , RA 2.56–9.34  $\mu\text{M}$ , and GA 6.00–9.42  $\mu\text{M}$  generated the optimum total phenolic content ( $51.46 \pm 4.92$  mg GAE) and total antioxidation capacity ( $45.99 \pm 1.41$  mg TE). The

predicted response agreed with the experimental response obtained using the optimum concentration. This agreement was confirmed by a good correlation coefficient ( $R^2=0.9322$  in Folin and  $R^2=0.9483$  in FRAP). Consequently, the CCD model was considered accurate and confidential for estimating the TPC and TAC for a synergistic effect.

Table 6. Optimum conditions predicted and experimental values of responses

Responses	Maximum values		Optimum concentration of antioxidant		
	Predicted	Experimental	CA ( $\mu\text{M}$ )	RA ( $\mu\text{M}$ )	GA ( $\mu\text{M}$ )
FOLIN (mg GAE)	53.48	$51.46 \pm 4.92$	7.87	6.75	9.42
FRAP (mg TE)	47.27	$45.99 \pm 1.41$	8.03	9.34	6.00

CA, Caffeic acid; RA, Rosmarinic acid; GA, Gallic acid; GAE, Gallic acid equivalent; TE, Trolox equivalent

The hydroxyl groups (with number and position) in phenolic compounds and the level of conjugation of the whole molecule are influential in the TAC. The TAC values of CA, GA, and RA are 1.23, 2.63, and 2.65 mg/TE, respectively (Berker et al., 2010). Accordingly, the antioxidant capacity values of GA and RA are close to each other in the same concentration. When the Folin and FRAP results of phenolic compounds (6  $\mu\text{M}$ ) were given in Table 7, it was shown that the highest value was obtained for gallic acid. This was consistent with the TAC values for phenolic substances at the same concentration. Looking at

the response surface graphs for TPC in Figure 1a, the maximum TPC value was observed when RA concentration was the highest and CA concentration was the lowest. Similarly, in Figure 1b, the maximum TPC value is observed when the concentration of GA is the highest, and the concentration of rosmarinic acid is the lowest. In the environment where GA and RA are present together, the TPC values may decrease due to the steric hindrance that occurs with the increase in the concentration of the compounds.

Table 7. Antioxidants synergistic/antagonistic effect

Phenolic compound	Total phenolic content	Total antioxidant capacity
	Folin (mg GAE)	FRAP (mg TE)
CA ( $\mu\text{M}$ )	13.33	6.09
RA ( $\mu\text{M}$ )	11.98	6.59
GA ( $\mu\text{M}$ )	18.81	22.06
Total	44.12	34.74
Optimum value	51.46	45.99
Interaction	Synergistic	Synergistic

GAE, Gallic acid equivalent; TE, Trolox equivalent; CA, Caffeic acid; RA, Rosmarinic acid; GA, Gallic acid

When Figure 1c is examined, the TAC value is also maximum at the highest concentration of RA and GA. Considering the optimization results (Table 6), the concentrations of phenolic substances for maximum phenolic substance/antioxidant capacity are different because the reaction conditions for both Folin and FRAP methods and the ability of phenolic substances to respond to this reaction are different. This is explained by the chemical structure of phenolic compounds and their steric hindrance each other. According to Table 7, the optimum concentration values were higher than the total results individually. Accordingly, the optimum concentration values results indicate that the antioxidant substances interact synergistically.

Similar to our study, Hajimehdipoor et al., 2014 investigated the synergistic antioxidant effects of four phenolic compounds, caffeic acid, gallic acid, rosmarinic acid and chlorogenic acid and two flavonoids, rutin and quercetin by FRAP method. The synergistic effect was evaluated by comparing the experimental antioxidant activity of the mixtures with the calculated theoretical values and the interactions of the compounds were determined. The results showed that the combination of gallic acid and caffeic acid showed significant synergistic effects (137.8%), while the other combinations were less strong. Gallic acid and rosmarinic acid showed 19.7% synergistic effect, while caffeic acid and rosmarinic acid showed 37.5% synergistic effect. In addition, the triple combination of gallic acid, caffeic acid and rosmarinic acid showed 13.7% synergistic effect. The synergistic effect between gallic acid and caffeic acid decreased with the addition of

rosmarinic acid. Skroza et al., 2022 reported that gallic acid has the highest FRAP value among the protocatechuic acid, gentisic acid, gallic acid, vanillic acid, syringic acid and proposed that the highest reducing power of gallic acid may be related to its chemical structure and three  $\cdot\text{OH}$  groups at positions 3, 4 and 5. They also reported that caffeic and rosmarinic acid had the highest FRAP values among *p*-coumaric acid, caffeic acid, ferulic acid, sinapic acid and rosmarinic acid and that this high activity may be related to the structure of rosmarinic acid (two phenolic rings with two  $\cdot\text{OH}$  groups in the ortho position and an unsaturated double bond and  $-\text{COOH}$ ) and the structure of caffeic acid (catechol structure and distance between  $-\text{COOH}$  group and functional groups). They also found synergistic interaction between caffeic and rosmarinic acid.

#### Evaluation of the synergistic effects of antioxidants against DNA oxidative base damage by GC-MS/MS

The chromatograms of the control and test samples are displayed in Figures 2, 3, and 4. The amounts of oxidative DNA base damage products are given in Table 8. Some DNA base damage products were symbolized as below the limit of detection ( $< \text{LOD}$ ) in Table 8, for they were not detected by GC-MS/MS.

A total concentration of 178.93 ng of damaged products/mg DNA was found in the DNA (with the Fenton reaction) sample. The leading cause of oxidative DNA base damage products is hydroxyl free radicals generated by the Fenton reaction. The 7.87  $\mu\text{M}$  CA, 6.75  $\mu\text{M}$  RA, and 9.42  $\mu\text{M}$  GA (Folin-Ciocalteu) were added to the DNA (with the Fenton reaction) sample and a total

concentration of 112.43 ng of damaged products/mg of DNA damage was discovered. According to this result, the DNA damage was reduced by 37.17%. The 8.03  $\mu$ M CA, 9.34  $\mu$ M RA, and 6.00  $\mu$ M GA (FRAP) were added to the DNA (with the Fenton reaction) sample and a total concentration of 107.06 ng of damaged products/mg of DNA damage was obtained. Consequently, DNA damage was reduced by 40.17%. Phenolic compounds have a preventive effect on DNA oxidation due to their high antioxidant activity (Kaur et al., 2019; Nile and Park, 2014; Salar and Purewal, 2017). For example, the inhibitory effect of extracts containing gallic acid and caffeic acid on DNA oxidation has been frequently reported by authors (Chandrasekara and Shahidi, 2012; Kaur et al., 2018; Sudha et al., 2016). Aklan and Aybastier, 2024 investigated the effect of the extract

obtained from *Cichorium intybus* L. on the formation of oxidative DNA base damage products by GC–MS/MS. Accordingly, they found that the formation of DNA base damage products decreased by more than 75% when they used 25  $\mu$ L of *Cichorium intybus* L. extract, more than 76% when they used 50  $\mu$ L of extract, and more than 82% when they used 100  $\mu$ L of extract. *Cichorium intybus* L. extract is rich in phenolic compounds (epigallocatechin gallate, procyanidin B2 and A2, neohesperidin, rosmarinic acid, caffeic acid phenethyl ester, rutin and myricetin). The effect of phenolic compounds with high antioxidant activity on preventing DNA oxidation has been clearly demonstrated. In the results of our study, it was determined that gallic acid, caffeic acid and rosmarinic acid had an inhibitory effect on DNA oxidation in accordance with the literature.

Table 8. The amounts of oxidative DNA base damage products

DNA base damage products	Retention time (min)	DNA	Opt.FOLIN	Opt.FRAPH
56DHT	4.79	<LOD	0.24±0.07	<LOD
56DHU	4.81	<LOD	<LOD	<LOD
5H5MH	4.94	134.54±27.60	19.84±0.29	57.33±1.32
5HH	5.17	32.25±4.64	24.01±0.04	14.10±0.89
5FU	5.95	<LOD	2.47±0.07	2.59±0.25
5HU	6.22	0.85±0.06	1.15±0.03	0.54±0.09
5HMU	7.33	0.38±0.54	44.37±0.67	16.10±0.27
Alx	7.39	4.00±0.37	11.35±0.14	3.51±0.01
5HC	7.57	2.32±0.01	2.35±0.01	7.60±0.02
46D5NP	7.74	1.07±0.01	1.30±0.04	1.27±0.01
TG	8.2	0.54±0.08	1.87±0.09	1.04±0.07
5HMC	8.34	<LOD	0.50±0.02	<LOD
46D5FP	9.76	<LOD	<LOD	<LOD
8HA	11.29	<LOD	<LOD	<LOD
2HA	12.47	<LOD	<LOD	<LOD
FG	12.7	2.97±0.01	2.97±0.01	2.97±0.01
28DHA	13.5	<LOD	<LOD	<LOD
8OHG	14.01	<LOD	<LOD	<LOD
Total	-	178.93	112.43	107.06

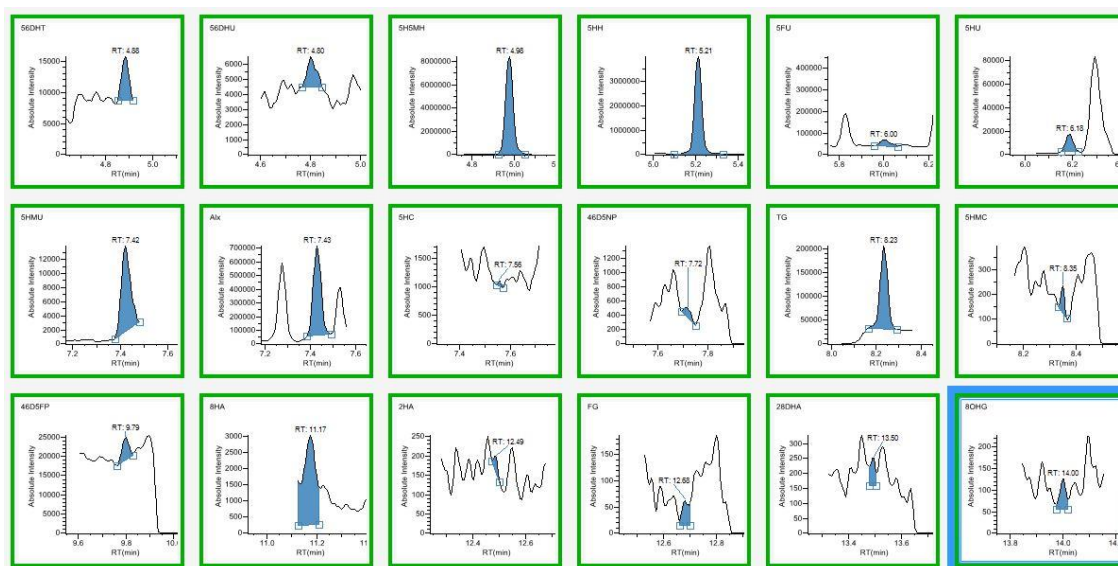


Figure 2. DNA damage product with Fenton oxidation. 56DHT: 5,6-dihydrothymine, 5H5MH: 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5HH: 5-hydroxy hydantoin, 5HC: 5-hydroxycytosine, 2HA: 2-hydroxyadenin, 28DHA: 2,8-dihydroxyadenine, 56DHU: 5,6-dihydrouracil, 8OHG: 8-hydroxy-2-deoxyguanine, 5FU: 5-formyluracil, 5HU: 5-hydroxyuracil, TG: thymine glycol, 5HMC: 5-(hydroxymethyl) cytosine, 8HA: 8-hydroxyadenine, and FG: 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 5HMU: 5-(hidroxymethyl) uracil, Alx: alloxane, 46D5NP: 4,6-diamino-5-nitropyrimidine, 46D5FP: 4,6-diamino-5-(formylamino) pyrimidine.

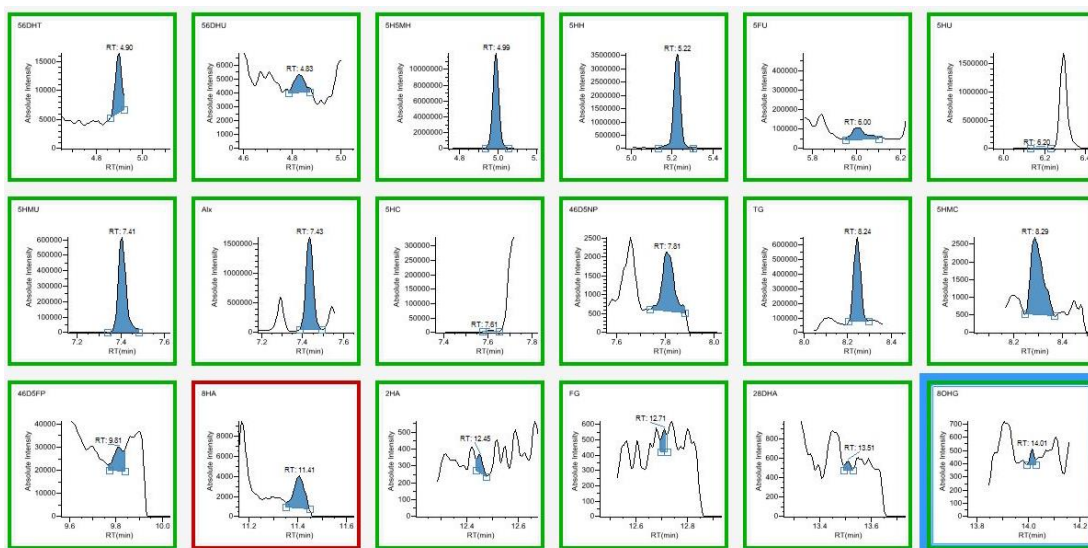


Figure 3. Chromatograms of DNA base damage products (at optimum concentrations determined by Folin analysis). 56DHT: 5,6-dihydrothymine, 5H5MH: 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5HH: 5-hydroxy hydantoin, 5HC: 5-hydroxycytosine, 2HA: 2-hydroxyadenin, 28DHA: 2,8-dihydroxyadenine, 56DHU: 5,6-dihydrouracil, 8OHG: 8-hydroxy-2-deoxyguanine, 5FU: 5-formyluracil, 5HU: 5-hydroxyuracil, TG: thymine glycol, 5HMC: 5-(hydroxymethyl) cytosine, 8HA: 8-hydroxyadenine, and FG: 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 5HMU: 5-(hidroxymethyl) uracil, Alx: alloxane, 46D5NP: 4,6-diamino-5-nitropyrimidine, 46D5FP: 4,6-diamino-5-(formylamino) pyrimidine.

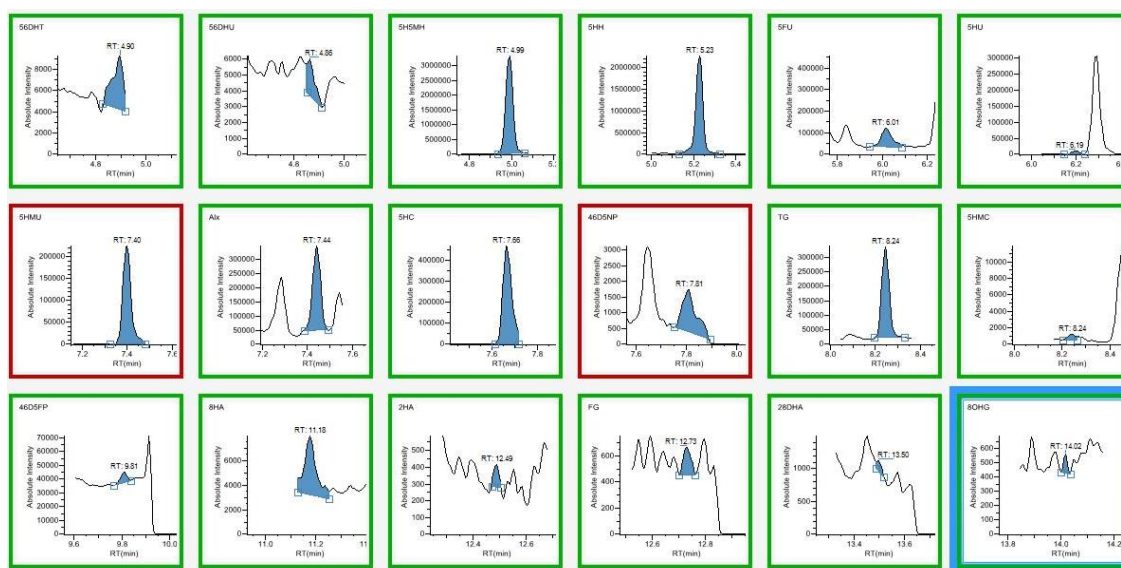


Figure 4. Chromatograms of DNA base damage products (at optimum concentrations determined by FRAP analysis). 56DHT: 5,6-dihydrothymine, 5H5MH: 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5HH: 5-hydroxy hydantoin, 5HC: 5-hydroxycytosine, 2HA: 2-hydroxyadenin, 28DHA: 2,8-dihydroxyadenine, 56DHU: 5,6-dihydrouracil, 8OHG: 8-hydroxy-2-deoxyguanine, 5FU: 5-formyluracil, 5HU: 5-hydroxyuracil, TG: thymine glycol, 5HMC: 5-(hydroxymethyl) cytosine, 8HA: 8-hydroxyadenine, and FG: 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, 5HMU: 5-(hidroxymethyl) uracil, Alx: alloxane, 46D5NP: 4,6-diamino-5-nitropyrimidine, 46D5FP: 4,6-diamino-5-(formylamino) pyrimidine.

## CONCLUSION

Phenolic compounds have many different applications in various sectors such as food, medicine and cosmetics due to their high antioxidant activity. Various applications of phenolic compounds are not limited to a single phenolic compound, but combined applications are also very popular. The interaction of phenolic compounds in combined applications is highly effective on the desired antioxidant activity. Therefore, it is very important to determine at which concentrations phenolic compounds show synergistic or antagonistic antioxidant activity. This study revealed the synergistic antioxidant activities of rosmarinic acid, caffeic acid and gallic acid phenolics. A mixture of rosmarinic acid, caffeic acid and gallic acid was found to have a reducing effect on the formation of oxidative base damage products caused by the hydroxyl radical formed as a result of the Fenton reaction in calf thymus DNA at the concentration where the total antioxidant properties were maximum. The results obtained provide information that maximum antioxidant activity will be obtained at

the concentrations determined in the study during the application of these three phenolic compounds to various systems.

## FUNDING

The authors received no support from any organization for this study.

## DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare to have no competing interests in this article.

## ETHICAL APPROVAL

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

## REFERENCES

Aklan, A., Aybastier, Ö. (2024). Characterization of *Cichorium intybus* L. extract in preventing oxidative DNA base damage using Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (GC–MS/MS). *Analytical Letters*, 1–10.

- <https://doi.org/10.1080/00032719.2024.2372675>
- Andrés, C.M.C., Pérez de la Lastra, J.M., Juan, C.A., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E. (2023). Polyphenols as Antioxidant/Pro-Oxidant compounds and donors of reducing species: Relationship with human antioxidant metabolism. *Processes*, 2023, 11(9), 2771. <https://doi.org/10.3390/PR11092771>
- Aybastier, Ö., Demir, C. (2021). Optimization and validation of ultrasensitive GC–MS/MS method to measure oxidatively induced DNA damage products and role of antioxidants in oxidation mechanism. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 200, 114068. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2021.114068>
- Berker, K.I., Güçlü, K., Demirata, B., Apak, R. (2010). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. *Analytical Methods*, 2(11), 1770–1778. <https://doi.org/10.1039/C0AY00245C>
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M.L. (2010). Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 15(4), 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2010.04.003>
- Ceylan, D., Tuna, G., Kirkali, G., Tunca, Z., Can, G., Arat, H.E., Kant, M., Dizdaroglu, M., Özerdem, A. (2018). Oxidatively-induced DNA damage and base excision repair in euthymic patients with bipolar disorder. *DNA Repair*, 65, 64–72. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2018.03.006>
- Chandrasekara, A., Shahidi, F. (2012). Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 226–237. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.11.001>
- Dawbaa, S., Aybastier, Ö., Demir, C. (2017). Ultrasensitive determination of DNA oxidation products by gas chromatography–tandem mass spectrometry and the role of antioxidants in the prevention of oxidative damage. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1051, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.014>
- De Guzman, R., Tang, H., Salley, S., Ng, K.Y.S. (2009). Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil- and poultry fat-based biodiesel. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(5), 459–467. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1373-8>
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102–1115. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00826-2)
- Dreher, D., Junod, A.F. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer*, 32(1), 30–38. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(95\)00531-5](https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00531-5)
- Ferguson, L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1–2), 89–111.
- Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R., Shekarchi, M. (2014). Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3), 35–40.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Irwandi, J., Che Man, Y.B., Kitts, D.D., Bakar, J., Jinap, S. (2000). Synergies between plant antioxidant blends in preventing peroxidation reactions in model and food oil systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 945–951.
- Jiang, D., Rusling, J.F. (2019). Oxidation chemistry of DNA and p53 tumor suppressor gene. *ChemistryOpen*, 8(3), 252. <https://doi.org/10.1002/OPEN.201800292>
- Karkar, B., Şahin, S. (2022). Determination of phenolic compounds profiles and antioxidant properties of oleaster (*Elaeagnus angustifolia* L.) grown in Turkey. *European Food Research and*

- Technology*, 248(1), 219–241. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03875-y>
- Kaur, C., Kapoor, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(7), 703–725. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2001.00513.X>
- Kaur, P., Dhull, S.B., Sandhu, K.S., Salar, R.K., Purewal, S.S. (2018). Tulsi (*Ocimum tenuiflorum*) seeds: in vitro DNA damage protection, bioactive compounds and antioxidant potential. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 1530–1538. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9768-6>
- Kaur, P., Purewal, S.S., Sandhu, K.S., Kaur, M. (2019). DNA damage protection: an excellent application of bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0237-9>
- Mohamed, H.M.A. (2011). Antioxidant synergy effect of rosemary aqueous extract and green tea flavanol-rich concentrate for superior protection of buffalo meatloaves. *Serbia Zootehnie*, 56, 242–52.
- Munteanu, I.G., Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Nile, S.H., Park, S.W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.04.007>
- Şahin, S., Karkar, B. (2019). The antioxidant properties of the chestnut bee pollen extract and its preventive action against oxidatively induced damage in DNA bases. *Journal of Food Biochemistry*, 43(7), e12888. <https://doi.org/10.1111/JFBC.12888>
- Salar, R.K., Purewal, S.S. (2017). Phenolic content, antioxidant potential and DNA damage protection of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) cultivars of North Indian region. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(1), 126–133. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9379-z>
- Saucier, C.T., Waterhouse, A.L. (1999). Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4491–4494. <https://doi.org/10.1021/jf990352t>
- Seal, T., Chaudhuri, K., Pillai, B., Chakrabarti, S., Mondal, T., Auddy, B. (2020). Evaluation of antioxidant activities, toxicity studies and the DNA damage protective effect of various solvent extracts of *Litsea cubeba* fruits. *Heliyon*, 6(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03637>
- Skroza, D., Šimat, V., Vrdoljak, L., Jolić, N., Skelin, A., Čagalj, M., Frleta, R., Generalić Mekinić, I. (2022). Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among phenolic acids in the model matrices using FRAP and ORAC methods. *Antioxidants*, 11(9), 1784. <https://doi.org/10.3390/antiox11091784>
- Srinivas, U.S., Tan, B.W.Q., Vellayappan, B.A., Jeyasekharan, A.D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Sudha, M.L., Dharmesh, S.M., Pynam, H., Bhimangouder, S.V., Eipson, S.W., Somasundaram, R., Nanjarajurs, S.M. (2016). Antioxidant and cyto/DNA protective properties of apple pomace enriched bakery products. *Journal of Food Science and Technology*, 53(4), 1909–1918. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2151-2>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Tsao, R. (2015). Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. In *Handbook of Antioxidants for Food Preservation* (pp.335–347). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00013-0>
- Wang, S., Meckling, K.A., Marccone, M.F., Kakuda, Y., Tsao, R. (2011). Synergistic, additive, and antagonistic effects of food mixtures on total antioxidant capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), 960–968. <https://doi.org/10.1021/jf1040977>



Ye, M., Dewi, L., Liao, Y.C., Nicholls, A., Huang, C.Y., Kuo, C.H. (2023). DNA oxidation after exercise: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Physiology*, 14, 1275867. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2023.1275867> /BIBTEX

Zhang, Y., Wu, S., Qin, Y., Liu, J., Liu, J., Wang, Q., Ren, F., Zhang, H. (2018). Interaction of

phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 240, 1072–1080. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.100>



## THE IMPACT OF STARTER CULTURES ON QUARK TYPE CHEESE PRODUCTION

Gökçe EMİNOĞLU\*

Ankara University Faculty of Agriculture Department of Dairy Technology, Ankara, Turkey

Received/Geliş: 06.06.2024; Accepted/Kabul: 01.08.2024; Published online/Online baskı: 22.08.2024

Eminoğlu, G. (2024). The impact of starter cultures on quark type cheese production. GIDA (2024) 49 (5) 791-804 doi: 10.15237/gida.GD24060

Eminoğlu, G. (2024). Starter kültürlerin quark tipi peynir üretimine etkisi. GIDA (2024) 49 (5) 791-804 doi: 10.15237/gida.GD24060

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of starter cultures on the physicochemical and microbiological properties, texture, yield, and consumer preferences of quark type cheese. For this purpose, three different quark cheeses were manufactured by using commercial starter cultures. The microbiological, physicochemical, textural, and sensory properties of the cheese samples were determined at 1<sup>st</sup>, 14<sup>th</sup>, and 28<sup>th</sup> days of the storage period. The results showed that the kind of starter culture used in production influences the composition and yield of the obtained quark cheeses. It has been determined that the use of kefir culture in quark cheese production influences the moisture and water holding capacity, and as a result, improves its spreadability. Also, the sensory analysis exhibited that cheese produced with kefir culture had higher texture and taste-flavor acceptability. The study indicates that kefir culture may be successfully used in quark cheese production.

**Keywords:** Quark cheese, starter culture, DVS culture, commercial culture

### STARTER KÜLTÜRLERİN QUARK TİPİ PEYNİR ÜRETİMİNE ETKİSİ

#### ÖZ

Bu çalışma, starter kültürlerin quark tipi peynirlerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özelliklerine, tekstürüne, verimine ve tüketici tercihlerine etkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla ticari starter kültürler kullanılarak üç farklı quark peyniri üretilmiştir. Peynir örneklerinin mikrobiyolojik, fizikokimyasal, tekstürel ve duysal özellikleri depolama süresinin 1, 14 ve 28. günlerinde belirlenmiştir. Sonuçlar, starter tipinin peynirin bileşimini ve verimini etkilediğini göstermiştir. Quark peyniri üretiminde kefir kültürü kullanımının, peynirin nem ve su tutma kapasitesini etkilediğini, buna bağlı olarak da sürülebilirliğin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, duysal analizler, kefir kültürüyle üretilen peynirin doku ve lezzet bakımından daha yüksek kabul edilebilirliğe sahip olduğunu göstermiştir. Çalışma, kefir kültürünün quark peyniri üretiminde başarıyla kullanılabileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Quark peyniri, starter kültür, DVS kültür, ticari kültür

\* Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: bayramg@ankara.edu.tr

☎: (+90) 312 596 1355

☎: (+90) 312 318 2219

Gökçe Eminoğlu; ORCID no: 0000-0001-6759-5342

## INTRODUCTION

Quark is a soft, spreadable, and fresh cheese characterized by a colour spectrum ranging from porcelain white to creamy yellow, coupled with a slightly sour taste. Quark can be made from skimmed milk, cream, or whole milk (Chauhan et al., 2022). It is produced through an acid coagulation process facilitated by mesophilic lactic acid bacteria (LAB) introduced to milk. While traditionally produced without rennet, modern dairy industries now incorporate rennet to enhance syneresis, minimize casein losses from whey, and achieve a firmer curd structure (Miloradovic et al., 2018).

The existence of live microorganisms and the activity of beta-galactosidase in quark cheese serve as safeguards against lactose intolerance. Additionally, quark boasts high nutritional value owing to its elevated protein content. (Chauhan et al., 2022). By implementing specific modifications in the quark cheese production process, such as reducing fat content, increasing protein and calcium levels, and introducing diverse antioxidants and probiotic microorganisms, it becomes feasible to craft a cheese with enhanced functional properties and positive health contributions (Duric et al., 2007; Guneser and Aydin, 2022; Kim et al., 2019).

Enhancing the texture and taste of cheese through the careful selection of appropriate starter cultures is a crucial method for advancing the growth of the cheese industry (Jia et al., 2021). Producing lactic acid from lactose is probably the most crucial step in cheese making. This process is accomplished by specially selected cultures of different types of lactic acid bacteria that are added to milk. Starter cultures are microorganisms with known properties that provide the product with the desired taste, aroma, and structure. The production of standard and quality products in the dairy industry depends on using starter cultures with appropriate characteristics (Fox et al., 2016). While starter cultures generate compounds that enhance the flavor of the product, it is noteworthy that fresh cheeses often exhibit similar flavors and aromas (Jia et al., 2021). Hence, the choice of starter

culture for the production of fresh fermented products holds significant importance in shaping the taste and aroma perception of consumers. Furthermore, Bekele et al. (2019) and Hordofa (2018) established that employing distinct starter cultures in the production of soft fresh cheese had an impact on the overall cheese yield.

Numerous studies have explored the use of diverse starter cultures in cheeses maturation, consistently revealing their profound influence on various properties of cheeses (Celik and Tarakci, 2017; Jia et al., 2021). While there is an abundance of literature on quark cheese, particularly regarding its production using different raw materials or by-products (Guneser and Aydin, 2022; Ozturkoglu-Budak et al., 2021), there is a paucity of information concerning the use of different starter cultures in fresh cheeses, specifically in quark production. Given the significant impact of starter cultures on cheese yield, flavor, and texture, this study aimed to investigate the potential application of various starter cultures to enhance the quality and organoleptic properties of quark cheese. To achieve this objective, three distinct commercial starter cultures were utilized in quark cheese production. Subsequently, compositional, textural, and sensory analyses were conducted to identify the most suitable starter culture for quark cheese manufacturing.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Raw milk used in the production of quark was obtained from Ankara University, Faculty of Agriculture, Pilot Dairy Plant. Three different commercial DVS cultures were used in the production of quark cheese. Codes, compositions and suppliers of the starter cultures are given in Table 1.

### Production of quark cheese

In total, 15 L raw cow's milk (3.5 % fat, 12.05% dry matter, 3.2% protein and pH 6.6) was pasteurized in a plate pasteurizer at  $75\pm 2$  °C for 1 min. and was cooled to 28 °C and then divided into 3 equal parts. Afterward, 0.3% (w/v) DVS-C, DVS-K, and DVS-B starter cultures were

inoculated to each part of milk as instructed by the manufacturer and 0.01% (v/v) rennet (Naturen mandra 175, Chr Hansen) was added to each pasteurized milk simultaneously with starter

cultures. The samples were kept for about 16 h at 25°C until the pH reached 4.6 where coagulum was formed. The curd was cut and put into the cheese cloths to separate the whey.

Table 1. Starter cultures and contents used in the study

Sample name	Culture codes	Composition	Supplier
DVS-C	R-703	<i>Lactococcuslactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcuslactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	Chr-Hansen
DVS-K	Choozit Kefir DC1	<i>Lactococcuslactis</i> subsp. <i>Leuconostoc</i> subsp. <i>Lactobacillus</i> subsp. <i>Streptococcus thermophilus</i> , Kefir grains microflora and Kefir yeasts	Danisco
DVS-B	CH N11	<i>Lactococcuslactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcuslactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcuslactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	Chr-Hansen

DVS: Direct vat set

For further drainage of the whey, the curd was left in the cheese cloth for 24 hours at 18 to 20°C. When the separation into whey was completed, cheese samples were vacuum-packed using polyethylene bags and stored at 4°C for 28 days and analyzed during storage periods with fourteen days intervals. The preliminary experiment determined that quark cheese can be consumed for about 4 weeks based on sensory properties. Consequently, this study investigated the alterations occurring in quark cheese over the 28-day storage period. The experiment was carried out in duplicate.

#### Gross composition, physicochemical analysis and yield

The pH of the samples was measured by direct insertion of a pH electrode into the cheese. Titratable acidity was determined according to the AOAC (1995) and expressed as percentage of lactic acid. Total dry matter contents were determined as per standard IDF (1982) methods. Total fat was determined according to the Gerber- Van gulik method and total protein and water-soluble nitrogen were prepared as indicated by Kuchroo et al. (1982) and measured by the Kjeldahl method. Ripening index was calculated following formula:

$$(\text{WSN}/\text{TN}) \times 100 \quad (\text{TN}; \text{total nitrogen, WSN}; \text{water soluble nitrogen}).$$

Cheese yield was calculated as actual ( $Y_a$ ) (Fox et al., 2016) and dry matter cheese yield ( $Y_{dm}$ ) were determined using this formula;

$$Y_a = 100 \times (\text{Weight of cheese} \div \text{weight of milk})$$

$$Y_{dm} = Y_a (100 - MD) \div 100 \quad (\text{MD}; \text{moisture content of cheese}) \quad (\text{Fenelon Guinee, 1999}).$$

The water-holding capacity (WHC) of the samples were measured according to Tiwari et al. (2021) and values were calculated as follows:

$$\text{WHC} (\%) = (1 - W_1 / W_2) \times 100$$

( $W_1$ : Weight of whey after centrifugation,  $W_2$ : Sample weight).

All measurements were carried out in duplicate to ensure the robustness and reliability of the results.

#### Microbiological analysis of quark cheese

In total, 10 g sample were homogenized with 90 mL Ringer's solution in a Stomacher (Bag Mixer 400 VW, Interscience, France) for 90 s Total mesophilic aerobic bacteria (TMAB) were enumerated using Plate count agar (Merck, Darmstadt, Germany) incubated at 35-37 °C for 2 days. *Lactococci* spp. were counted on M17 agar (Merck, Darmstadt, Germany) incubated under aerobic conditions at 37 °C for 48 h (Halkman,

2005). *Lactobacilli* spp. were counted on DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Merck, Darmstadt, Germany) under anaerobic incubation (using anaerobic jar) 37 °C for 72 h. Yeast and mold were enumerated on Potato dextrose agar (PDA) (Merck, Darmstadt, Germany) incubated at 25 °C for 5 days.

### Colour analysis

$L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values expressing colour values were measured with a chroma meter (Konica Minolta CR 410 Sensing Inc., Osaka, Japan). Colour analysis of the samples was determined by the CIE-LAB optical system ( $L^*$ =lightness,  $a^*$ =red-green, and  $b^*$ =yellow-blue).  $\Delta E$  and  $C$  (chroma) values of the samples were calculated with the formulas given below:

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

$$C = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

### SDS-PAGE Electrophoresis

SDS-Page method was used for electrophoretic identification of whey proteins and caseins (Mini-PROTEAN Tetra cell, Bio-Rad Laboratories Ltd., UK) (Hayaloglu et al., 2011). Samples were prepared as follows; 20 g of each sample was centrifuged at 3000 x g for 30 min. at 4 °C. The supernatant was mixed 1:1 with sample buffer (25 mL stacking gel buffer, 20 mL glycerol, 40 mL 10% w/v SDS solution, 10 mL 2-mercaptoethanol, 5 mL bromophenol blue), 0.4 g of sample was mixed with 10 mL of sample buffer and centrifuged at 10.000 x g for 10 min. at 4 °C. Acrylamide concentration of the stacking and separating gel was 4% (w/v) and 12.5% (w/v), respectively. Thirteen microliters of sample were loaded in each well. Gels were run at 200 V. Gels were kept in fixing solution (containing 100 mL of 100% TCA (w/v), 330 mL of methanol and 540 mL of distilled water) for 60 min and then stained with Coomassie Brilliant Blue R250 for about 12 h.

### Texture profile and spreadability analysis

Textural properties of quark cheeses were analyzed for firmness, stickiness, work of shear and work of adhesion at 1<sup>st</sup>, 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days of storage. Texture and spreadability analysis were

performed using TA-XTi plus texture analyzer (Stable Micro Systems, UK) with P/60C conical perspex cap. The sample was placed into the female cone and pressed down to eliminate air pockets. Excess sample was scraped off with a knife to leave a flat test area. Allowed the samples to equilibrate to the approximate 20 °C temperature before testing. The compression distance was set at 23 mm, the test speed during compression was 3 mm/sec, and the post-test speed was 10 mm/sec.

### Sensory analysis

The sensory evaluation of the cheese samples was carried out by seven panelists, who are experienced in the sensory evaluation of milk and dairy products, consisting of members of the Department of Dairy Technology at University of Ankara. The panelists, aged between 35-55, consisted of 5 women and 2 men. Sensory evaluation was performed on days 1<sup>st</sup>, 14<sup>th</sup>, and 28<sup>th</sup> according to scoring card described by Bodyfelt et al. (1988). For sensory evaluation, samples were randomly coded with 3-digit numbers, placed in plastic containers, and presented to the panelists with a glass of water to improve mouth taste. Panelists evaluated the cheeses for taste and flavor (0 to 10 points), colour-appearance (0 to 5 points) and body-texture (0 to 5 points).

### Statistical analysis

Statistical analyses of the data were performed using Minitab package program (version 19, Minitab Inc., State College, PA). Analysis of variance (Two-way ANOVA) was carried out to identify statistical differences among cheese batches and storage. Finally, Tukey's Multiple Range Test was applied for the determination of statistically significant differences;  $P < 0.05$  was accepted as significance level.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Gross composition, physicochemical analysis and yield

Gross composition and yield of quark cheese are given in Table 2. The utilization of different starter cultures in quark cheese production altered the composition of the cheese. Specifically, cheese

made with kefir starter culture (DVS-K) exhibited lower fat and dry matter values compared to the other samples. Since the acidification kinetics were affected during fermentation, the matrix may have had wider pores and weaker bonds. This may increase losses with whey. Since it is found in yeasts in kefir culture, lipolysis may have occurred more intensively during fermentation and serum and free fatty acids may have been lost. There were no significant differences between the composition of the DVS-C and DVS-B samples ( $P>0.05$ ). The actual yield outcomes indicated a noteworthy increase in samples with added kefir culture compared to the counterparts ( $P<0.05$ ). Notably, the cheese incorporating the kefir starter

exhibited a surprisingly higher overall quantity. However, dry matter yield of cheese was slightly lower. LAB and yeasts in the microflora of kefir grain produce exopolysaccharide (EPS) (Hamet et al., 2015). Due to the viscosity-increasing, water-binding and bio-thickening properties of EPS (Tiwari et al., 2021), the moisture level in the cheese increased with this culture, thus increasing the actual yield. Likewise, Ahmed et al. (2005) noted a 2% increase in moisture and yield in cheeses crafted from EPS-producing cultures. In contrast, owing to the elevated moisture content in the DVS-K sample, the dry matter yield was comparatively lower than other samples.

Table 2. Gross composition and yield (mean  $\pm$  SE) of quark cheese samples on day 1.

	DVS-C	DVS-K	DVS-B
Fat (%)	17.75 $\pm$ 0.25 <sup>A</sup>	16 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	17.25 $\pm$ 0.25 <sup>A</sup>
Protein (%)	11.49 $\pm$ 0.33	10.77 $\pm$ 0.31	11.19 $\pm$ 0.13
Dry matter (%)	34.00 $\pm$ 0.96 <sup>A</sup>	28.81 $\pm$ 1.19 <sup>B</sup>	33.83 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>
Ya (%)	19.22 $\pm$ 0.38 <sup>A</sup>	21.30 $\pm$ 0.38 <sup>B</sup>	19.70 $\pm$ 0.26 <sup>A</sup>
Ydm (%)	6.85 $\pm$ 0.47	6.51 $\pm$ 0.57	6.62 $\pm$ 0.11

DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVS-B; cheese made using culture CH-N11.

Different uppercase letters show significant differences among the samples. ( $P<0.05$ )

Non-lettering columns indicates the differences among the samples are not found significant ( $P>0.05$ )

Ya: actual yield, Ydm: dry matter cheese yield. SE:Standard error

Table 3 presents the physicochemical properties of quark cheeses produced with various starter cultures during storage. Notably, the utilization of different starters in quark cheese production influenced both pH and titratable acidity values. Significantly, only the pH value demonstrated a discernible impact over the storage period, while the lactic acid values in quark cheese samples remained nearly stable throughout the duration of storage. The decrease in pH is associated with the lactose fermentation metabolism of the starter culture, which produces lactic acid and lowers the pH (Costa et al., 2015). Besides, the rate of milk acidification in cheesemaking, resulting in the production of lactic acid and a subsequent decrease in pH, depends on the type of starter cultures employed (Kongo, 2013). No significant differences in pH and titratable acidity were observed between samples DVS-C and DVS-B as

well as their gross compositions ( $P>0.05$ ). However, the DVS-K sample exhibited distinct acidity values from the others. Coincidentally Ozturkoglu-Budak et al. (2021) reported elevated acidity in quark cheese produced with kefir in alignment with the findings of this study. The water-soluble nitrogen (WSN) level in cheese served as an indicator of the cheese ripening degree. Notably, the DVSK sample had higher water-soluble nitrogen level and ripening index compared to the other samples. This observation can be attributed to the higher activity of LAB and yeasts in the DVSK starter culture, as supported by higher total bacteria counts in this sample. Similar findings were reported by Dimitrellou et al. (2010) that the level of proteolysis was high due to the presence of mixed microflora with high proteolytic activity in kefir.

Table 3. Change of pH, titration acidity (% lactic acid), water soluble nitrogen (WSN) and ripening index of quark cheese samples during storage (mean  $\pm$  SE)

	Days	Samples			Average
		DVS-C	DVS-K	DVS-B	
pH (%)	1	4.16 $\pm$ 0.03	4.09 $\pm$ 0.15	4.27 $\pm$ 0.02	4.14 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
	14	4.12 $\pm$ 0.05	4.01 $\pm$ 0.00	4.17 $\pm$ 0.04	4.08 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
	28	4.04 $\pm$ 0.01	3.95 $\pm$ 0.01	4.03 $\pm$ 0.00	3.97 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>
	Average	4.11 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup>	3.93 $\pm$ 0.05 <sup>B</sup>	4.16 $\pm$ 0.10 <sup>A</sup>	
Titratable acidity (%)	1	1.42 $\pm$ 0.03	1.48 $\pm$ 0.02	1.42 $\pm$ 0.02	1.46 $\pm$ 0.02
	14	1.45 $\pm$ 0.00	1.54 $\pm$ 0.04	1.45 $\pm$ 0.02	1.48 $\pm$ 0.04
	28	1.50 $\pm$ 0.02	1.59 $\pm$ 0.02	1.44 $\pm$ 0.04	1.51 $\pm$ 0.07
	Average	1.46 $\pm$ 0.03 <sup>B</sup>	1.53 $\pm$ 0.06 <sup>A</sup>	1.44 $\pm$ 0.03 <sup>B</sup>	
WSN (%)	1	0.13 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	14	0.14 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>
	28	0.15 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>
	Average	0.13 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	0.15 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>B</sup>	
Ripening index (%)	1	7.52 $\pm$ 0.00	8.40 $\pm$ 0.13	7.09 $\pm$ 0.3	7.67 $\pm$ 0.58 <sup>c</sup>
	14	7.87 $\pm$ 0.11	8.91 $\pm$ 0.12	8.17 $\pm$ 0.17	8.31 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>
	28	8.34 $\pm$ 0.10	9.54 $\pm$ 0.03	8.58 $\pm$ 0.24	8.82 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>
	Average	7.90 $\pm$ 0.34 <sup>B</sup>	8.95 $\pm$ 0.47 <sup>A</sup>	7.94 $\pm$ 0.67 <sup>B</sup>	

DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVS-B; cheese made using culture CH-N11.

The different lowercase letters in the same column indicate significant differences during the storage period ( $P < 0.05$ ).

The different upper case letters in the same row indicate significant differences among the samples ( $P < 0.05$ ).

Non-lettering columns indicates the differences among the average values are not found significant

( $P > 0.05$ )

SE: Standard error

Table 4 presents water holding capacity (WHC) analysis results of the samples. The WHC of the DVS-K sample was consistently lower than that of the other samples, except on day 28. While the WHC values of both DVS-C and DVS-B samples decreased over the storage period, by the end of storage, they exhibited no significant difference from the WHC value of the DVS-K sample. According to Diamantino et al. (2014) WHC is inversely related to syneresis, explaining why cheeses with higher moisture content tend to have lower WHC values. Hinrichs et al. (2004)

additionally observed that an elevated total solids content enhances interactions between the serum phase and solids, leading to increased WHC. Given the DVS-K sample low dry matter and high moisture content (Table 2), it is expected that the WHC value would be lower than that of the other samples. Additionally, it is noteworthy that the presence of exopolysaccharides has an impact on WHC, and a reduction in syneresis has been reported in products fermented with EPS-producing cultures (Tiwari et al., 2021).

Table 4. Change of water holding capacity values of quark cheese samples during storage (mean  $\pm$  SE)

	Days	DVS-C	DVS-K	DVS-B
Water holding capacity (%)	1	91.14 $\pm$ 0.59 <sup>AB</sup>	84.25 $\pm$ 0.63 <sup>EF</sup>	91.94 $\pm$ 0.70 <sup>A</sup>
	14	90.66 $\pm$ 0.60 <sup>ABC</sup>	84.00 $\pm$ 0.78 <sup>F</sup>	90.42 $\pm$ 0.70 <sup>ABCD</sup>
	28	87.81 $\pm$ 0.60 <sup>BCDE</sup>	86.78 $\pm$ 0.92 <sup>DEF</sup>	87.13 $\pm$ 0.21 <sup>CDEF</sup>

DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVS-B; cheese made using culture CH-N11.

Different capital letters indicate differences between samples and storage days ( $P < 0.05$ ) SE: Standard error

**Microbiological properties**

TMAB, yeast-mold, *Lactococcus* and *Lactobacillus* counts of quark cheese samples are given in Table 5. The use of different starters in cheese production affected the TMAB count ( $P < 0.05$ ). Additionally, TMAB decreased over storage. *Lactococcus* spp. count was not affected by different cultures. However, number of *Lactococcus* spp. decreased during the storage ( $P < 0.05$ ). Starter LAB added to milk during cheese production reached its maximum at the end of production. However, the number of starters gradually decreases due to adverse conditions such as salt concentration, low pH and temperature and lack of fermentable carbohydrates during storage (Blaya et al., 2018). Differences were observed in the number of lactobacilli in the samples

depending on the variation of the culture used. Moreover, the number of *Lactobacillus* spp. decreased over the storage period ( $P < 0.05$ ). All microbial counts of the DVS-K sample were higher than the others, a correlation supported by the corresponding physicochemical properties (refer to Table 3). These findings align with similar studies using kefir as a starter in cheese production (Dimitrellou et al., 2015; Kourkoutas et al., 2006). Yeast presence was exclusive to the DVS-K sample, potentially attributed to the yeasts inherent in the DVS-K culture. A previous study incorporating kefir grains in butter production similarly revealed elevated yeast levels, emphasizing their association with the characteristic yeasts present in kefir microflora (Karaca et al., 2018).

Table 5. Changes in microbial counts of quark cheese sample during storage (mean  $\pm$  SE)

	Days	Samples			Average
		DVS-C	DVS-K	DVS-B	
TMAB (log CFU/g)	1	7.77 $\pm$ 0.05	8.06 $\pm$ 0.32	6.13 $\pm$ 0.37	7.31 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>
	14	6.70 $\pm$ 0.08	6.84 $\pm$ 0.12	5.17 $\pm$ 0.14	6.23 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>
	28	5.88 $\pm$ 0.05	5.65 $\pm$ 0.27	5.14 $\pm$ 0.18	5.55 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>
	Average	6.78 $\pm$ 0.9 <sup>A</sup>	6.85 $\pm$ 1.01 <sup>A</sup>	5.47 $\pm$ 0.68 <sup>B</sup>	
<i>Lactococcus</i> ssp. (log CFU/g)	1	6.17 $\pm$ 1.21	6.87 $\pm$ 0.93	6.73 $\pm$ 0.82	6.59 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>
	14	5.24 $\pm$ 1.26	6.77 $\pm$ 0.18	5.07 $\pm$ 0.19	5.69 $\pm$ 1.06 <sup>ab</sup>
	28	4.80 $\pm$ 1.24	5.34 $\pm$ 0.36	3.76 $\pm$ 0.29	4.63 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>
	Average	5.41 $\pm$ 1.36	6.33 $\pm$ 0.91	5.19 $\pm$ 1.32	
<i>Lactobacillus</i> spp. (log CFU/g)	1	6.02 $\pm$ 0.41	6.62 $\pm$ 1.04	5.48 $\pm$ 0.11	6.37 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>
	14	5.19 $\pm$ 0.18	6.43 $\pm$ 0.15	3.85 $\pm$ 0.77	5.49 $\pm$ 1.25 <sup>ab</sup>
	28	5.57 $\pm$ 0.44	5.26 $\pm$ 0.23	2.78 $\pm$ 0.13	4.54 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>
	Average	6.26 $\pm$ 0.69 <sup>A</sup>	6.10 $\pm$ 0.86 <sup>A</sup>	4.03 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>	
Yeast and mold (log CFU/g)	1	0.00 $\pm$ 0.00	3.27 $\pm$ 0.3	0.00 $\pm$ 0.00	1.09 $\pm$ 1.55
	14	0.00 $\pm$ 0.00	3.25 $\pm$ 0.37	0.00 $\pm$ 0.00	1.08 $\pm$ 1.54
	28	0.00 $\pm$ 0.00	3.04 $\pm$ 0.36	0.00 $\pm$ 0.00	1.01 $\pm$ 1.44
	Average	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	3.18 $\pm$ 0.36 <sup>A</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	

DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVS-B; cheese made using culture CH-N11.

The different lowercase letters in the same column indicate significant differences during the storage period ( $P < 0.05$ ).

The different uppercase letters in the same row indicate significant differences among the samples ( $P < 0.05$ ).

Non-lettering columns and rows indicates the differences among the average values are not found significant ( $P > 0.05$ )

SE: Standard error, TMAB: Total mesophilic aerobic bacteria

**Colour properties of quark cheese**

The L\*, a\* and b\* values of quark cheese samples measured on the 1<sup>st</sup>, 14<sup>th</sup>, and 28<sup>th</sup> days of storage are given in Table 6. Colour stands out as a primary sensory attribute influencing consumer

acceptance and purchase decisions. Numerous factors, including the colour of raw milk, production method, cheese ripening stage, and packaging technique, contribute significantly to the colour properties of cheese. The colour of



quark cheese is milky white to slightly yellowish (Chauhan et al., 2022). The utilization of different starters in quark cheese production revealed noteworthy variations in the colour properties of the cheeses. The L\* value is an expression of the brightness, a significant difference in the L values of all samples was observed on day 1. Brightness value of the DVS-K sample was higher than the other samples on day 1. The L value decreased during storage in all samples. While positive and negative a\* values indicate reddish and greenish colours, respectively, positive and negative b\* values indicate yellowish and bluish colours, respectively (Pathare et al., 2013). a\* value of the DVSC sample was different from the other samples. DVS-C sample had lower a\* values than the rest of the samples. The b\* value of the DVS-K sample was different from the other samples. This can be attributed to the lower fat and dry matter content of the DVS-K sample (Table 2).

There was no difference in the b\* value of DVS-C and DVS-B samples, except for day 14. Colour saturation or chroma (C values) indicates vividness or colour purity from the distance between the point and the origin. The longer this distance, the more vivid or saturated the colour (Ávila et al., 2008). High chroma value expressed a high human-perceived colour intensity of a sample (Pathare et al., 2013). As regards chroma values DVS-C and DVS-B samples presented more vivid colour than DVS-K samples.  $\Delta E$  value (total colour difference) indicates the colour difference magnitude between the control and other samples. (Patras et al., 2011).

Perceptible differences in colour are classified as very distinct ( $\Delta E > 3$ ), distinct ( $1.5 < \Delta E < 3$ ), and slightly different ( $1.5 < \Delta E$ ). Therefore, the difference between samples is not perceptible because the  $\Delta E$  value is less than 1.5.

Table 6. Colour,  $\Delta E$  and chroma (C) values of quark cheese samples (mean  $\pm$  SE)

	Days	Samples		
		DVS-C	DVS-K	DVS-B
L*	1	88.35 $\pm$ 0.03 <sup>BCD</sup>	88.74 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	87.45 $\pm$ 0.4 <sup>F</sup>
	14	88.29 $\pm$ 0.02 <sup>CDE</sup>	88.41 $\pm$ 0.03 <sup>BC</sup>	88.27 $\pm$ 0.03 <sup>DE</sup>
	28	88.30 $\pm$ 0.2 <sup>BCDE</sup>	88.43 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>	88.18 $\pm$ 0.05 <sup>E</sup>
a*	1	-2.67 $\pm$ 0.5 <sup>C</sup>	-2.47 $\pm$ 0.03 <sup>AB</sup>	-2.34 $\pm$ 0.02 <sup>A</sup>
	14	-2.89 $\pm$ 0.2 <sup>D</sup>	-2.60 $\pm$ 0.05 <sup>BC</sup>	-2.43 $\pm$ 0.03 <sup>A</sup>
	28	-2.62 $\pm$ 0.02 <sup>C</sup>	-2.42 $\pm$ 0.02 <sup>A</sup>	-2.46 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>
b*	1	12.72 $\pm$ 0.03 <sup>AB</sup>	12.01 $\pm$ 0.05 <sup>F</sup>	12.76 $\pm$ 0.6 <sup>AB</sup>
	14	12.78 $\pm$ 0.16 <sup>A</sup>	12.22 $\pm$ 0.03 <sup>E</sup>	12.51 $\pm$ 0.12 <sup>C</sup>
	28	12.67 $\pm$ 0.14 <sup>AB</sup>	12.36 $\pm$ 0.01 <sup>D</sup>	12.64 $\pm$ 0.14 <sup>BC</sup>
$\Delta E$	1	0.00 $\pm$ 0.0 <sup>G</sup>	0.83 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	0.95 $\pm$ 0.00 <sup>A</sup>
	14	0.00 $\pm$ 0.0 <sup>G</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>C</sup>	0.53 $\pm$ 0.01 <sup>D</sup>
	28	0.00 $\pm$ 0.0 <sup>G</sup>	0.39 $\pm$ 0.00 <sup>E</sup>	0.20 $\pm$ 0.00 <sup>F</sup>
C	1	12.99 $\pm$ 0.03 <sup>AB</sup>	12.26 $\pm$ 0.3 <sup>F</sup>	12.97 $\pm$ 0.4 <sup>AB</sup>
	14	13.10 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	12.49 $\pm$ 0.5 <sup>E</sup>	12.74 $\pm$ 0.5 <sup>CD</sup>
	28	12.94 $\pm$ 0.02 <sup>B</sup>	12.59 $\pm$ 0.6 <sup>DE</sup>	12.87 $\pm$ 0.4 <sup>BC</sup>

DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVSB; cheese made using culture CH-N11.

Different uppercase letters show the significant differences among the samples and storage days for each property ( $P < 0.05$ ). SE: Standard error

### SDS-PAGE Electrophoresis

Figure 1 shows the SDS-PAGE electrophoretic separation of the cheese samples. Although there was a difference in the WSN results according to Table 3, this difference was not related to caseins.

There were no remarkable differences between the cheeses in terms of  $\beta$ -casein and  $\alpha_s$ -casein degradation levels. However, a slight time-dependent degradation of both  $\beta$ -casein and  $\alpha_s$ -casein degradation was obvious. It has been

reported that  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ lactoglobulin are resistant to proteases in semi-hard and ultrafiltered cheeses (Grappin et al., 1985). Therefore, it is expected that these proteins will remain stable throughout the storage period in fresh cheeses. Besides, a high degree of proteolysis is not expected in fresh cheese such as

quark. Furthermore, while the proteolytic activity of cheese starters can vary depending on the strain, it is recognized that many commercial starter strains employed in fresh dairy products exhibit weak to moderate proteolytic activity (Akal et al., 2022).

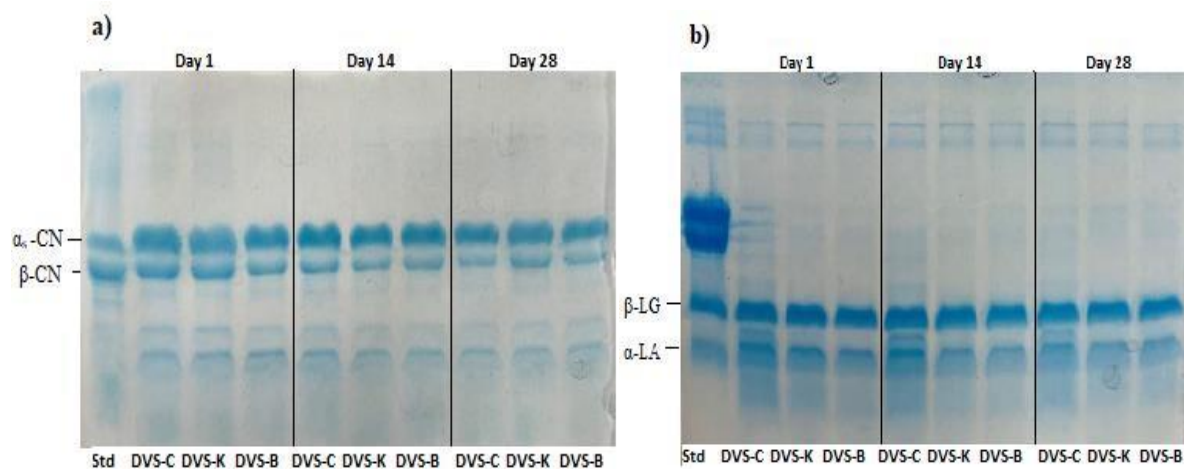


Figure 1. Electrophoretograms of casein (a) and whey protein (b) fractions of quark cheeses. DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVS-B; cheese made using culture CH-N11. Std; sodium-caseinate, CN: casein, Lg; lactoglobulin, La: lactalbumin

### Textural and spreadability properties

Table 7 shows texture and spreadability properties of quark cheese samples. The textural properties of fresh cultured products are more related to raw material quality, production technology (such as heat treatment, starter culture, homogenization, incubation) and postproduction processing and storage conditions (Fox et al., 2016). Firmness is defined as the force required to compress the cheese between the fingers and is a measurement of the peak force applied to the product during testing. It was found that the DVS-K sample was significantly different from the others in terms of all textural and spreadability properties on day 1 ( $P < 0.05$ ). The firmness value of the DVS-K was lower than the other samples. Quark cheese made using cultures CH N11 (DVS-B) and R-703 (DVS-C) had lower moisture and higher total solid contents, which might explain the higher resistance to deformation compared with the quark cheese made from using kefir cultures. Changes in fat and moisture content of cheese directly affect firmness and spreadability

properties. Stickiness is the degree of adhesion of the product to the tongue and palate during chewing. The more negative the value, the stickier the product. DVS-C and DVS-B samples were stickier than the DVS-K sample. Spreadability is expressed as a measure of how easily and uniformly a product can be deformed and spread over the surface of the layer (Mirela Lučan et al., 2020). Work of shear defines the force required to spread the product on a surface (e.g., bread) and expresses the opposite of the ability to be spreadable. A higher value in this context indicates reduced spreadability of the product. Samples with lower firmness were expected to require a lower work of shear to spread, and indeed the DVS-K sample confirmed this. Work of adhesion is expressed as the area of the negative peak during the return of the upper probe to the origin. The work of adhesion value of the DVS-K sample was lower from the other samples on day 1. The use of kefir culture in the production of quark cheese affected the spreadability properties of the cheese positively,

but it caused a weakening in the texture of the cheese. This phenomenon could be attributed to the generation of exopolysaccharides by kefir microflora in the sample DVS-K. A parallel study noted that cheeses crafted from an EPS a

smoother, creamier, more moist, and softer consistency, attributed to the water retention properties of EPS (Ahmed et al., 2005).

Table 7. Textural and spreadability analysis of quark cheese samples (mean  $\pm$  SE)

	Days	Samples		
		DVS-C	DVS-K	DVS-B
Firmness (g)	1	569.88 $\pm$ 38.62 <sup>A</sup>	271.37 $\pm$ 9.22 <sup>CD</sup>	560.41 $\pm$ 46.76 <sup>A</sup>
	14	383.39 $\pm$ 15.69 <sup>BC</sup>	228.15 $\pm$ 8.22 <sup>CD</sup>	371.26 $\pm$ 0.55 <sup>BC</sup>
	28	483.26 $\pm$ 4.77 <sup>AB</sup>	383.35 $\pm$ 35.61 <sup>BC</sup>	464.06 $\pm$ 1.92 <sup>AB</sup>
Stickiness (g.sec)	1	-143.70 $\pm$ 9.31 <sup>A</sup>	-79.76 $\pm$ 2.28 <sup>CD</sup>	-139.52 $\pm$ 14.18 <sup>AB</sup>
	14	-94.37 $\pm$ 0.49 <sup>CD</sup>	-63.34 $\pm$ 4.29 <sup>D</sup>	-92.60 $\pm$ 1.45 <sup>CD</sup>
	28	-113.14 $\pm$ 0.41 <sup>ABC</sup>	-105.09 $\pm$ 10.50 <sup>ABC</sup>	-103.54 $\pm$ 2.73 <sup>BC</sup>
Work of Shear (g)	1	1188.79 $\pm$ 72.51 <sup>A</sup>	552.79 $\pm$ 17.62 <sup>C</sup>	1187.25 $\pm$ 129.73 <sup>A</sup>
	14	786.87 $\pm$ 35.44 <sup>BC</sup>	460.79 $\pm$ 10.09 <sup>C</sup>	753.89 $\pm$ 16.51 <sup>BC</sup>
	28	965.47 $\pm$ 45.07 <sup>AB</sup>	795.00 $\pm$ 73.64 <sup>BC</sup>	919.60 $\pm$ 42.81 <sup>AB</sup>
Work of Adhesion (g.sec)	1	-88.95 $\pm$ 8.15 <sup>A</sup>	-56.51 $\pm$ 1.48 <sup>C</sup>	-79.33 $\pm$ 7.97 <sup>AB</sup>
	14	-55.10 $\pm$ 1.76 <sup>C</sup>	-45.31 $\pm$ 3.85 <sup>C</sup>	-56.17 $\pm$ 0.59 <sup>C</sup>
	28	-65.34 $\pm$ 3.03 <sup>ABC</sup>	-68.69 $\pm$ 7.90 <sup>ABC</sup>	-61.40 $\pm$ 0.18 <sup>ABC</sup>

DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVSB; cheese made using culture CH-N11.

Different uppercase letters show significant differences among the samples and storage days for each property ( $P < 0.05$ )

SE: Standard error

### Sensory properties

Figure 2. shows the results of sensorial attributes of quark cheese samples. DVS-K sample was significantly different from the others in terms of body and texture ( $P < 0.05$ ). Regarding body texture properties, DVS-K sample had high scores than the other samples. The taste-flavor of DVS-K sample were higher than the other samples on day 1 and 14. Panelists also noted that DVS-K cheese had a pleasant, refreshing, and slightly acidic taste. It is probably due to the yeast population responsible for flavor-aroma of kefir. Yeasts in kefir culture contribute to taste and aroma by producing alcohol and carbon dioxide, and kefir used as a starter culture in cheese manufacturing, it has a positive effect on the taste, aroma and structure of cheese (Bengoa et al., 2019; Nielsen et al., 2014). In a previous study, distinctions between traditional and probiotic cultures in quark cheese production were uncovered, leading to the conclusion that the utilization of a probiotic culture had a positive

influence on the sensory properties of quark cheese (Duric et al., 2007). However, DVS-K had the lowest taste and aroma score at the end of storage. It may be due to the DVS-K samples acidity increased too much at the end of the storage. There was no difference between the samples in terms of colour and appearance during storage ( $P > 0.05$ ).

### CONCLUSIONS

The results of the present study clearly showed that the use of kefir starter culture in the manufacture of quark cheese influenced its physicochemical, textural and sensorial properties. There was a change in gross composition of the cheese using DVS-K culture. The fat, dry matter and protein amount was lower than the other samples. The actual yield increased, but the dry matter yield decreased in DVS-K sample. The results indicated that DVS-K cultures slightly increased the rate of proteolysis in quark cheeses. Use of different culture did not

affect colour and appearance. According to sensory results, the DVS-K sample was the most liked sample regarding taste and flavor. However, it was the least preferred taste sample due to the high acidity at the end of storage. This may negatively affect the shelf life of the DVS-K sample. The use of kefir culture positively affected the spreadability of the cheese. No significant differences were found between DVS-C and

DVS-B samples regarding physicochemical, textural and microbiological properties, and the DVS-B sample scored the lowest in taste and flavor. These results have shown that quark cheese with better spreadable and sensory properties can be obtained by using kefir culture to improve the aroma and texture in the production of quark cheese.

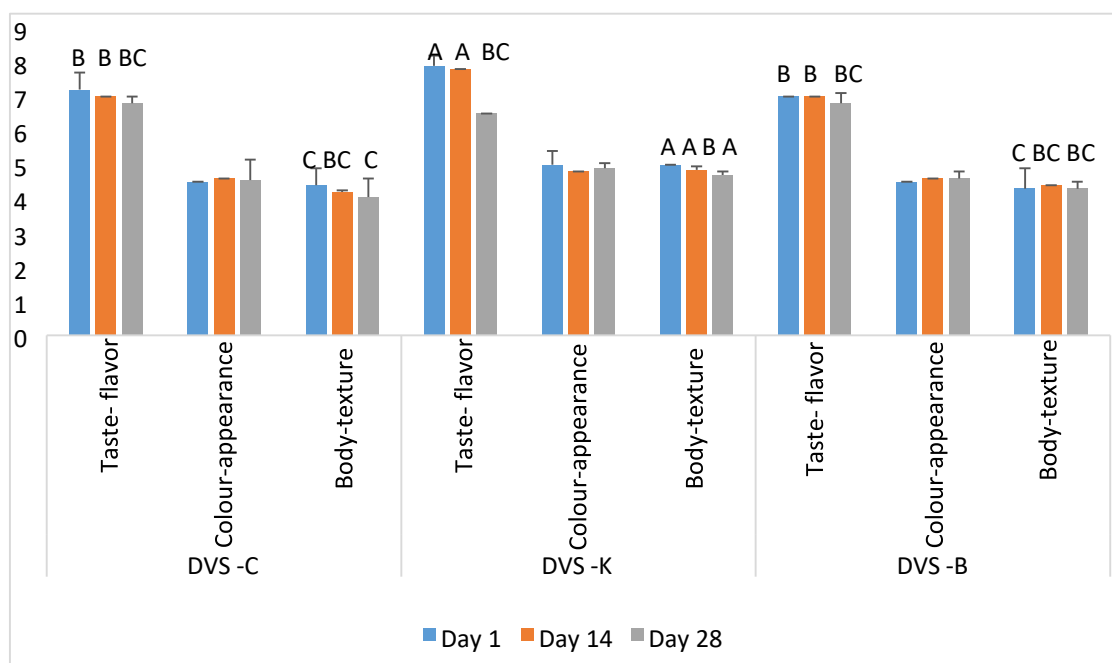


Figure 2. Sensorial attributes of quark cheese samples.

DVS-C; cheese made using culture R-703, DVS-K; cheese made using culture Kefir DC-1 and DVS-B; cheese made using culture CH-N11.

Non-lettering graphs indicates the differences among the values are not found significant ( $P > 0.05$ )

Different uppercase letters indicate that the difference among the samples is significant ( $P < 0.05$ )

### CONFLICT OF INTEREST

The author has no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

### REFERENCES

Ahmed, N. H., El Soda, M., Hassan, A. N., Frank, J. (2005). Improving the textural properties of an acid-coagulated (Karish) cheese using exopolysaccharide producing cultures. *LWT – Food Science and Technology*, 38(8), 843-847. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.10.001>

Akal, C., Koçak, C., Kanca, N., Özer, B. (2022). Utilization of Reconstituted Whey Powder and Microbial Transglutaminase in Ayran (Drinking Yogurt) Production. *Food Technology Biotechnology*, 60(2), 253-265. <https://doi.org/10.17113/ftb.60.02.22.7383>

AOAC. (1995). Official methods of analysis of the Association of Official Chemists. In.

Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemists International.

- Ávila, M., Garde, S., Nuñez, M. (2008). The influence of some manufacturing and ripening parameters on the colour of ewes' milk cheese. *Milchwissenschaft*, 63(2), 160-164.
- Bekele, B., Hansen, E. B., Eshetu, M., Ipsen, R., Hailu, Y. (2019). Effect of starter cultures on properties of soft white cheese made from camel (*Camelus dromedarius*) milk. *Journal of Dairy Science*, 102(2), 1108-1115. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15084>
- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., Abraham, A. G. (2019). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, 126(3), 686-700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- Blaya, J., Barzideh, Z., LaPointe, G. (2018). Symposium review: Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment1. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3611-3629. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13345>
- Bodyfelt, F. W., Tobias, J., Trout, G. M. (1988). *The Sensory Evaluation of Dairy Products*. Van Nostrand Reinhold,
- Celik, O. F., Tarakci, Z. (2017). The effects of starter cultures on chemical, biochemical and sensory properties of low-fat Tulum cheeses during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 70(4), 583-591. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12377>
- Chauhan, A. K., Yadav, P., Singh, R. B., Singh, R. K., Singh, R. K., On-Saard, W., On-Saard, E. (2022). Chapter 18 - Quark cheese: characteristics, preparation, and health effects as a functional food. In R. B. Singh, S. Watanabe, A. A. Isaza (Eds.), *Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-Communicable Diseases* (pp. 267-278). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819815-5.00045-8>
- Costa, M. P., Balthazar, C. F., Rodrigues, B. L., Lazaro, C. A., Silva, A. C., Cruz, A. G., Conte Junior, C. A. (2015). Determination of biogenic amines by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD) in probiotic cow's and goat's fermented milks and acceptance. *Food Science & Nutrition*, 3(3), 172-178. <https://doi.org/10.1002/fsn3.200>
- Diamantino, V. R., Beraldo, F. A., Sunakozawa, T. N., Penna, A. L. B. (2014). Effect of octenyl succinylated waxy starch as a fat mimetic on texture, microstructure and physicochemical properties of Minas fresh cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 356-362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.001>
- Dimitrellou, D., Kandyli, P., Kourkoutas, Y., Koutinas, A. A., Kanellaki, M. (2015). Cheese Production Using Kefir Culture Entrapped in Milk Proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(1), 213-230. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1568-4>
- Dimitrellou, D., Kandyli, P., Mallouchos, A., Komaitis, M., Koutinas, A. A., Kourkoutas, Y. (2010). Effect of freeze-dried kefir culture on proteolysis in feta-type and whey-cheeses. *Food Chemistry*, 119(2), 795-800. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.052>
- Duric, M. S., Ilicic, M. D., Milanovic, S. D., Caric, M. D., Tekic, M. N. (2007). Nutritive characteristics of probiotic quark as influenced by type of starter. *Acta Periodica Technologica*, 2007(38). <https://doi.org/10.2298/APT0738011D>
- Fenelon, M. A., Guinee, T. P. (1999). The Effect of Milk Fat on Cheddar Cheese Yield and Its Prediction, Using Modifications of the Van Slyke Cheese Yield Formula. *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2287-2299. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)754779](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)754779)
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., McSweeney, P. L. H. (2016). *Fundamentals of Cheese Science* (2nd ed.). Springer. <https://books.google.com.tr/books?id=vCLkDAAAQBAJ>
- Grappin, R., Rank, T. C., Olson, N. F. (1985). Primary Proteolysis of Cheese Proteins During Ripening. A Review. *Journal of Dairy Science*, 68(3), 531-540. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)80855-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)80855-9)
- Guneser, O., Aydin, B. (2022). Characterization of Quark-like probiotic cheese produced from a

- mixture of buffalo milk and cow milk. *Mlječarstvo*, 72(3). <https://doi.org/10.15567/mlječarstvo.2022.0306>
- Halkman, A. K. (2005). Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. 1. baskı. Başak Matbaacılık Ltd. Şti. 358. Ankara
- Hamet, M. F., Piermaria, J. A., Abraham, A. G. (2015). Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *LWT - Food Science and Technology* 63(1), 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.097>
- Hayaloglu, A. A., Topcu, A., Koca, N. (2011). Peynir analizleri (Cheese analysis). In A. A. Hayaloglu B. H. Ozer (Eds.), *Peynir biliminin temelleri (Principles of cheese science)* (pp. 508-517). Sidas.
- Hinrichs, R., Götz, J., Noll, M., Wolfschoon, A., Eibel, H., Weisser, H. (2004). Characterisation of the water-holding capacity of fresh cheese samples by means of low resolution nuclear magnetic resonance. *Food Research International*, 37(7), 667-676. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.02.005>
- Hordofa, B. B. (2018). Acidification process and properties of soft cheese made from cow milk using different starter cultures. *African Journal of Food Science and Technology*, 9(2), 12-18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14303/ajfst.2018.229>
- IDF. (1982). International IDF Standard 4A:1982: Cheese and Processed Cheese: Determination of the Total Solids Content. (reference Method): Reference Method. In Brussels: International Dairy Federation.
- Jia, R., Zhang, F., Song, Y., Lou, Y., Zhao, A., Liu, Y., Peng, H., Hui, Y., Ren, R., Wang, B. (2021). Physicochemical and textural characteristics and volatile compounds of semihard goat cheese as affected by starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 270-280. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18884>
- Karaca, Y., Gün, İ., Seydim, A. C., Guzel-Seydim, Z. (2018). Production and quality of kefir cultured butter. *Mlječarstvo*, 68(1), 64-72. <https://doi.org/doi:10.15567/mlječarstvo.2018.0108>
- Kim, K.-T., Hwang, J. E., Eum, S. J., Paik, H.-D. (2019). Physiochemical Analysis, Antioxidant Effects, and Sensory Characteristics of Quark Cheese Supplemented with Ginseng Extract. *Food Science of Animal Resources*, 39(2), 324-331. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2019.e26>
- Kongo, J. M. (2013). Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments. In K. Marcelino (Ed.), *Lactic Acid Bacteria* (pp. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55937>
- Kourkoutas, Y., Kandylis, P., Panas, P., Dooley, J. S., Nigam, P., Koutinas, A. A. (2006). Evaluation of freeze-dried kefir coculture as starter in feta-type cheese production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6124-6135. <https://doi.org/10.1128/aem.03078-05>
- Kuchroo, C., CN, K., PF, F. (1982). Fractionation of the water-soluble-nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. *Milchwissenschaft*, 37, 651-653.
- Miloradovic, Z., Miocinovic, J., Kljajevic, N., Tomasevic, I., Pudja, P. (2018). The influence of milk heat treatment on composition, texture, colour and sensory characteristics of cows' and goats' Quark-type cheeses. *Small Ruminant Research*, 169, 154-159. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.09.012>
- Mirela Lučan, Jasmina Ranilović, Vedran Slačanac, Tanja Cvetković, Ljiljana Primorac, Davorka Gajari, Helena Tomić Obrdalj, Marko Jukić, Čačić, J. L. (2020). Physico-chemical properties, spreadability and consumer acceptance of low-sodium cream cheese. *Mlječarstvo*, 70(1), 13-27. <https://doi.org/10.15567/mlječarstvo.2020.0101>
- Nielsen, B., Gürakan, G. C., Unlü, G. (2014). Kefir: a multifaceted fermented dairy product. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6(3-4), 123-135. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9168-0>

- Ozturkoglu-Budak, S., Akal, H. C., Türkmen, N. (2021). Use of kefir and buttermilk to produce an innovative quark cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 58(1), 74-84. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04516-0>
- Pathare, P. B., Opara, U. L., Al-Said, F. A.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36-60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Patras, A., Brunton, N. P., Tiwari, B. K., Butler, F. (2011). Stability and Degradation Kinetics of Bioactive Compounds and Colour in Strawberry Jam during Storage. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 1245-1252. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0226-7>
- Tiwari, S., Kavitate, D., Devi, P. B., Halady Shetty, P. (2021). Bacterial exopolysaccharides for improvement of technological, functional and rheological properties of yoghurt. *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1585-1595. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2021.05.140>



## NAR SUYUNUN ALJİNAT KÜRECİKLERİ İLE ENKAPSÜLASYONU: İŞLEM KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU

**Ferhan BALCI TORUN\***

Akdeniz Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Antalya, Türkiye

Geliş/Received: 07.02.2024; Kabul /Accepted: 16.08.2024; Online baskı /Published online: 24.08.2024

Balcı Torun, F. (2024). Nar suyunun aljinat kürecikleri ile enkapsülasyonu: İşlem koşullarının optimizasyonu. GIDA (2024) 49 (5) 805-819 doi: 10.15237/ gida.GD24024

*Balcı Torun, F. (2024). Encapsulation of pomegranate juice using alginate beads: Optimization of processing conditions. GIDA (2024) 49 (5) 805-819 doi: 10.15237/ gida.GD24024*

### ÖZ

Bu çalışmada nar suyunun aljinat kürecikleri ile enkapsülasyonunda işlem parametrelerinin elde edilen kapsüllerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Enkapsülasyon işleminin optimizasyonunda aljinat konsantrasyonu, CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonu, damlama hızı ve damlama yüksekliği bağımsız işlem değişkenleri olarak, kapsüllerin şekil faktörü, küreselliği ile toplam fenolik madde ise bağımlı değişkenler olarak seçilmiştir. Optimizasyon sonunda en uygun işlem koşulları aljinat konsantrasyonu %1.6, kalsiyum konsantrasyonu %3, damlama hızı 0.77 ve damlama yüksekliği 10 cm olarak belirlenmiştir. Sonuçlar mikrokapsüllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin farklı işlem koşullarından etkilendiğini göstermiştir. Damlama hızı ve yüksekliğinin artması ile kapsüllerin şeklinin mükemmel küreselliğe yaklaştığı, aljinat konsantrasyonunun artmasının ise damlacıkların küreselliğinin bozulmasına neden olduğu görülürken, aljinat konsantrasyonu ile damlama yüksekliğinin azalmasının elde edilen kapsüllerin toplam fenolik madde miktarını olumlu yönde etkilediği sonucuna ulaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Aljinat kürecikleri, enkapsülasyon, nar konsantresi, küresellik, şekil faktörü

## ENCAPSULATION OF POMEGRANATE JUICE USING ALGINATE BEADS: OPTIMIZATION OF PROCESSING CONDITIONS

### ABSTRACT

This study examines the effects of process parameters on the physical and chemical properties of capsules obtained by encapsulating pomegranate juice concentrate using the alginate beads. Alginate concentration, CaCl<sub>2</sub> concentration, dripping speed, and dripping height were selected as independent variables, while shape factor, sphericity, and total phenolic content of the capsules were the dependent variables. The optimum process conditions were determined as alginate concentration 1.6%, CaCl<sub>2</sub> 3%, drip rate 0.77 and drip height 10 cm. Results indicated that the physical and chemical properties of the microcapsules were influenced by different process conditions. Results indicated that the physical and chemical properties of the microcapsules were influenced by different process conditions. Increased dripping rate and height improved capsule sphericity, while higher alginate concentrations negatively affected droplet sphericity. Additionally, decreased alginate concentration and dripping height positively influenced the total phenolic content of the capsules.

**Keywords:** Alginate beads, encapsulation, pomegranate concentrate, sphericity, shape factor

\* Sorumlu yazar /Corresponding author

✉: ferhanbalci@akdeniz.edu.tr

☎: (+90) 242 310 2047

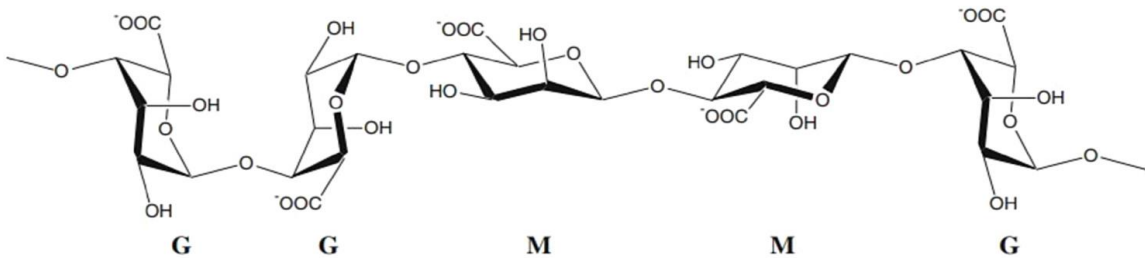
Ferhan Balcı Torun; ORCID no: 0000-0002-8972-1087



## GİRİŞ

Aljinat, özellikle kahverengi deniz yosunlarından ve ayrıca *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı bakterilerden ekstrakte edilen üronik asitlerin (mannuronik ve guluronik asitler) doğal bir polimeri olan aljinik asidin tuzudur (Bennacef vd. 2021). Gıda, nutrasötik ve farmasötik gibi alanlarda biyoaktif malzemelerin kapsülleme teknolojisi yoluyla kontrollü salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan hidrokolloidlerden biri olan aljinat; toksik ve antijenik olmayan, biyoyoumlu bir malzemedir (Ramdhan vd. 2020).

Aljinat, (1,4) glikozidik bağları ile bir araya gelen  $\beta$ -D-mannuronik asit (M blokları) ve  $\alpha$ -L-guluronik asit (G blokları) zincirinden oluşmaktadır (Şekil 1). Bu zincirlerin miktarı aljinat özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Bennacef vd. 2021). M blokları ile zengin bir aljinat daha esnek bir yapı göstermekte iken G blokları ile zengin bir aljinat ise daha sert bir yapı göstermektedir (Vold vd. 2006). Nitekim aljinatin elde edildiği kaynak ve ekstraksiyon yöntemi de viskozite, jelleşme, çözünürlük gibi özellikleri etkilemektedir (Da Silva vd. 2017).



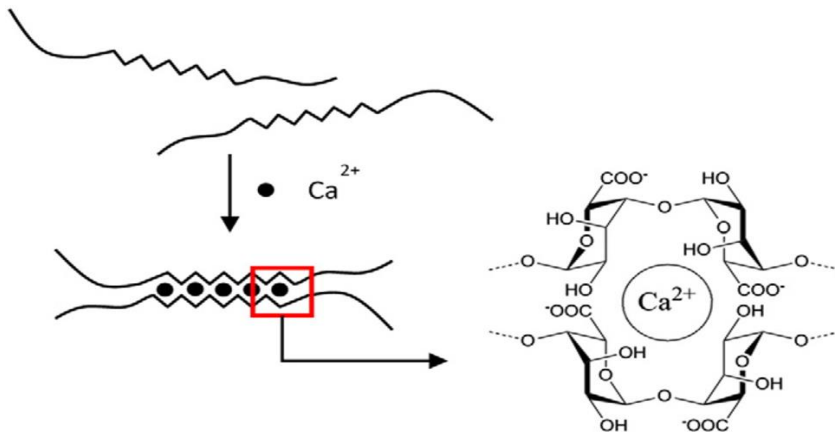
Şekil 1. Aljinatin yapısal özellikleri (M: mannuronik blokları, G: guluronat blokları)

Figure 1. Structural characteristics of alginate. M: mannuronate units; G: guluronate units

Aljinatin en önemli özelliği; aljinat jellerinin, filmlerinin, mikroparçacıklarının ve nanoparçacıklarının oluşumu için bir ön koşul olan iyonik çapraz bağlama yeteneği olarak da bilinen, özellikle kalsiyum iyonları olmak üzere çok değerlikli katyonlara seçici bağlanmasıdır (Selimoğlu ve Elibol 2010). Çapraz bağlı iyonların ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ) varlığında aljinat jel oluşumu oda sıcaklığında ve hatta daha düşük sıcaklıklarda meydana gelebilmekte ve elde edilen

yapı yüksek sıcaklıklarda bile stabilitesini koruyabilmektedir (Li vd. 2021).

Bu süreç, glukuronik asidin katyonlara doğru katlanıp birikmesi, ardından gerilen moleküler zincirlerinin sıralı bir bant yapısına dönüşmesi ve sonunda üç boyutlu bir molekül ağına sahip bir "yumurta kutusu" modelin (Şekil 2) oluşması ile gerçekleşmektedir (Leirvåg 2017, Ramdhan vd. 2020).



Şekil 2: Kalsiyum Aljinat için "Yumurta kutusu" modeli

Figure 2. "Egg-box" model for Calcium Alginate

Gıda ve kozmetik gibi sektörlerde en yaygın kullanılan  $Ca^{+2}$  iyonu olup, literatürde de kalsiyum aljinat kürecikleri ile ilgili birçok araştırma mevcuttur. Ca-aljinat kürecikleri, mikrobiyal hücrelerin, enzimlerin, hormonların, yağların, bitkisel ekstraktların ve aroma maddelerinin kapsüllemesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda kapsüllenen aktif materyalin stabilitesinin yanı sıra oluşan kapsülün

şeklini etkileyen faktörler de göz önüne alınmaktadır. Ca-aljinat küreciklerinin kapsülasyon etkinliği üzerine kapsül büyüklüğü, kapsüllerin şekli, kütle taşıma özellikleri, biyoyumluluğu, şişme kapasitesi, çözünürlüğü, yüzey morfolojisi gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmekte olup bu faktörler Çizelge 1’de özetlenmiştir (Lee vd. 2013, Balcı-Torun 2019).

Çizelge 1. Aljinat kürecikleri işleme etki eden faktörler

Table 1. Factors affecting the alginate beads

İşlem parametreleri <i>Process Parameters</i>	Büyükük <i>Size</i>	Şekil <i>Shape</i>
Aljinatın moleköl ağırlığı ( <i>Molecular weight of alginate</i> )	-	+
Aljinat çözeltisinin yoğunluğu ( <i>Density of alginate solution</i> )	+	+
Aljinat çözeltisinin yüzey gerilimi ( <i>Surface tension of alginate solution</i> )	++	++
Aljinat çözeltisinin viskozitesi ( <i>Viscosity of alginate solution</i> )	+	++
CaCl <sub>2</sub> çözeltisinin konsantrasyonu ( <i>Concentration of CaCl<sub>2</sub></i> )	++	++
CaCl <sub>2</sub> çözeltisinin vizkozitesi ( <i>Viscosity of CaCl<sub>2</sub></i> )	+	++
Damlama ucunun çapı ( <i>Dripping tip diameter</i> )	++	++
Damlama mesafesi ( <i>Collecting distance</i> )	+	++
CaCl <sub>2</sub> çözeltisinin karıştırma hızı ( <i>Stirring rate of CaCl<sub>2</sub></i> )	+	++
CaCl <sub>2</sub> çözeltisinin sıcaklığı ( <i>Temperature of CaCl<sub>2</sub></i> )	+	+
Boncukların depolama şartları ( <i>Bead storage conditions</i> )	++	+

++ Major etki, +minör etki, - etkisiz

++ Major effect, + minor effect, – no effect.

Aljinat kürecikleri yönteminden elde edilen kapsülün boyutunun küçük olması etken madde salınımını sınırlaması nedeni ile kapsülasyonun verimini ve performansını arttırmaktadır. Kapsüllerin küreselliği ise mekanik ve kimyasal stabilize üzerine oldukça etkilidir. Daha önceki bir çalışmada küresel olmayan kapsüllerin küresel olan kapsüllere göre mukavemetinin az olduğu bildirilmiştir (Lee vd. 2013). Başka bir çalışmada ise gözyaşı şeklindeki (kuyruklu) ve küresel olmayan kapsüllerde kırılma ve çatlamaların meydana gelerek kapsülün açıldığı rapor edilmiştir (Woo vd. 2007, Balcı-Torun 2019).

Aljinat damlacıkları belirli bir hacme ulaştıktan sonra damlaya uygulanan yerçekimi kuvveti ya da uygulanan dış kuvvetler etkisi ile ayrılmaktadır. Nitekim aljinat çözeltisinin damlatılma mesafesinin aljinat küreciklerinin şekli üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Genel olarak kısa damlama mesafesi kısa kuyruklu küreciklerin

oluşumuna yol açarken, uzun mesafelerde elde edilen küreciklerin deformasyona uğradığı gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin ise uzun mesafelerde deformasyona uğrayan aljinat küreciklerinin jelasyon banyosunda sertleşmeden önce yeniden küresel forma dönme zamanının artmasından kaynaklı olabileceği bildirilmiştir (Lee vd. 2013)

Literatürde aljinat kürecikleri yönteminin daha çok mikrobiyal hücrelerin enkapsülasyonunda yaygın olarak kullanıldığı gözlenmiştir. Ancak bu yöntem son yıllarda yağların, aroma maddelerinin ve biyoaktif bileşenlerin kapsülasyonunda da sıklıkla kullanılmaktadır.

Nar (*Punica granatum*) ülkemizin önemli tarım ürünlerinden biri olup, Antalya başta olmak üzere Muğla, Mersin ve Adana illerimizde önemli miktarda üretimi yapılmaktadır. 2022 yılı verilerine göre, Türkiye’de yaklaşık 291 bin

dekarlık alanda ve yaklaşık 14 milyon meyve veren ağaçtan toplam 681 bin ton nar üretilmektedir. 2023 yılında Türkiye’de toplam yaş meyve ve sebze ihracatında en fazla ihracatı yapılan ilk on meyve arasında beşinci sırada yer almakla birlikte meyve suyu ya da meyve suyu konsantresi olarak ihracatı da yüksek oranda yapılmaktadır (Hepaksoy vd 2023).

Nar meyvesinde bulunan fenolik asitler, flavonoidler ve tanenler gibi önemli miktarlarda biyoaktif bileşiklerin varlığı önemini arttırmıştır. Son yıllarda yetiştirme ve işleme teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte, tüketicilerin sağlığa yararlı gıdalara olan yönelimlerinin artmasına bağlı olarak ülkemizde nar üretimi ve ticareti artış göstermiştir. Nar meyvesi doğrudan sofralık olarak tüketiminin yanında nar ekşisi, nar suyu ve nar suyu konsantresi olarak da önemli miktarda tüketilmektedir. Özellikle ülkemizde nar suyu konsantresinin katma değeri yüksek ürünlerin üretimine yönelik ekonomik yöntem ve yaklaşımlar geliştirilmesi ve farklı ürünlere işlenebilir formlarına dönüştürülmesi ve bununla birlikte içeriğindeki önemli biyoaktif bileşenlerin korunması oldukça önem arz etmektedir. Nar, içerdiği yüksek antioksidanlar, vitaminler ve mineraller sayesinde sağlık üzerinde birçok olumlu etkiye sahiptir. Yapılan araştırmalar, narın özellikle kalp sağlığını korumada etkili olduğunu göstermektedir. Nar, kan basıncını düşürmeye yardımcı olmakta, kötü kolesterol seviyelerini düşürerek kalp hastalıkları riskini azaltmaktadır (Aviram ve Dornfeld, 2001). Ayrıca, narın anti-inflamatuar özelliği olduğu, kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatarak kanserle mücadelede de önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Adams vd. 2006, Shukla et al., 2008). Özellikle narın içerisinde bulunan elajik asit önemli bir antioksidan ve antikanserijen bir bileşiktir. Nar suyunun içerisindeki elajik asidin püskürtürerek kurutma yöntemi ile kapsülendiği birçok çalışma mevcuttur (Yekdane ve Goli 2019, Şavikin vd. 2021). Ancak nar suyu konsantresinin aljinat kürecikleri ile kapsüllemesinde işlem koşullarının son ürün üzerindeki etkilerini konu alan bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Bu doğrultuda çalışmada aljinat kürecikleri ile nar suyunun kapsüllemesi ve elde edilen kapsüllerin boyutuna

farklı konsantrasyonlardaki aljinat ve kalsiyum çözeltilerinin etkileri ile, aljinat çözeltisinin damlama yüksekliği ve hızının etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Literatürde aljinat kürecikleri yöntemi ile kapsülasyon tekniği daha çok mikroorganizmaların (Covarrubias vd 2012; Börner vd 2013) kapsüllemesinde kullanılmış olup meyve suyu veya bitkisel ekstraktların kapsülendiği çalışmalar (Yamdech vd 2012; Toprakçı vd 2022) oldukça azdır. Bu çalışmada daha çok mikroorganizmaların korunumu veya bitkisel ekstraktlarda etken maddenin enkapsülasyon etkinliği üzerine odaklanılmış olup çalışmada işlem parametrelerinin kapsüllerin şekilsel ve morfolojik özelliklerine etkisinin optimize edildiği bir çalışmaya da rastlanılamamıştır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan nar konsantresi MEYKON Meyve ve Kaynak Suları San. ve Tic. A.Ş firması tarafından temin edilmiştir. Analizlerde kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta Sigma-Aldrich’den (Darmstadt, Almanya) temin edilerek kullanılmıştır.

### Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kapsüllenecek nar suyu konsantresi firmadan temin edildikten sonra kullanılmadan hemen önce 65 °Briks’den 10 °Briks’e getirilmiştir. Optimizasyonda duvar materyali olarak kullanılan farklı konsantrasyonlardaki (%1, %1,5 ve %2) sodyum aljinat, seyreltilen nar suyu (10 °Briks) içerisinde çözündürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 10.000 rpm’de 5 dk boyunca homojenizatör yardımı ile (Ultraturrax T25 Basic Staufen, Almanya) karıştırılmış ve köpük oluşumunun giderilmesi için 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Elde edilen homojen aljinat-nar suyu karışımı şırınga pompası (Thermo Fisher Syringe Fusion 100, Massachusetts, ABD) ve şırınga (500µl, 22 G, Thermo Syringe, Massachusetts, ABD) ile manyetik karıştırıcıda balık yardımı ile karışmakta olan CaCl<sub>2</sub> çözeltisine (deneme deseninde belirtilen konsantrasyonlarda ve belirtilen yüksekliklerde) damlatılmıştır. Oluşan kapsüller 30 dk CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde bekletildikten

sonra saf suya alınmış ve kapsüllerin sertleşmesi için manyetik karıştırıcıda 750 rpm'de bekletilmiştir. Saf sudan kaba filtre kağıdı yardımı ile süzülen kapsüller, başka bir kaba filtre kağıdında 10 dk boyunca fazla suyu uzaklaştırıldıktan sonra analizlerde kullanılmıştır.

### Sodyum Aljinat Çözeltilerinin Viskozite Değerlerinin Belirlenmesi

Elde edilen kapsüllerin üretiminde sınır koşullarının belirlenebilmesi amacıyla viskozite değerleri Brookfield DV3T (ABD) viskozimetresi kullanılarak ölçülmüştür. Viskozimetre ölçümleri 25 °C'de TC spindle ile 200 rpm'de gerçekleştirilmiştir (Köksoy ve Kılıç, 2004).

### Aljinat Kürecikleri Yöntemi ile Elde Edilen Kapsüllerinin Boyutlarının ve Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Kapsüllerin boyut ve morfolojisinin belirlenmesinde stereo-mikroskop (Stemi 2000-C, Zeiss, Germany) ve AxioCamERc5 kamera (Stemi 2000-C, Zeiss, Göttingen, Germany) kullanılmıştır. Kapsüllerin boyut ölçümleri Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Almanya) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kapsüllerin boyutunun belirlenmesinde  $D_{min}$ ,  $D_{maks}$  ve  $D_{ort}$  değerleri ölçülmüştür. Elde edile aljinat küreciklerin şekillerinin tanımlanmasında, küreselliğe ne kadar yakın olduğunun tanımlanabilmesi için şekil faktörü (SF) ve küresellik değeri (KD) hesaplanmıştır. Şekil faktörünün hesaplanmasında Eşitlik 1, küreselliğin hesaplanmasında ise Eşitlik 2 kullanılmıştır (Lee vd. 2013).

$$\text{Şekil Faktörü (SF)} = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (1)$$

$$\text{Küresellik Değeri (K)} = \frac{D_{maks}-D_{min}}{D_{maks}+D_{min}} \quad (2)$$

A=alan  
P= çevre

$D_{maks}$ =Merkezden geçen maksimum çap (mm)

$D_{min}$ =Merkezden geçen minimum çap (mm)

### Toplam Fenolik Madde Miktarı

Kapsüllerin toplam fenolik madde miktarının belirlenebilmesi için mikrokapsüller öncelikle içerisinde kırık cam parçaları olan metanol ile 10 dk boyunca vortekste parçalanarak karıştırılmıştır.

Parçalanmış kapsüllerin üst fazından alınan ekstrakt 0.45 µm filtreden süzülerek analiz edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir (Skerget vd. 2005). Bu amaçla, ön çalışma ile elde edilen seyreltme oranından elde edilen ekstraktlardan 0.5 mL örnek üzerine 2.5 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi (%10) ve 2 mL %7.5'lik ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen karışım vortekste (DragonLab, MX-S) 30 sn karıştırıldıktan sonra 50°C'deki su banyosunda 5 dk bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler 10 dk karanlık bir ortamda bekletildikten sonra spektrofotometrede (Shimadzu UV-vis 160A) 760 nm dalga boyunda absorbansları okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit çözeltileri ile oluşturulan eğri yardımıyla mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır.

### Optimizasyon ve İstatistiksel Yaklaşım

Nar suyu konsantrasyonunun aljinat kürecikleri ile enkapsülasyon işleminin optimizasyonunda aljinat konsantrasyonu,  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonu, damlama hızı ve damlama yüksekliği bağımsız işlem değişkenleri olarak, elde edilen kapsüllerin SF ve KD değerleri ile toplam fenolik madde miktarı ise cevaplar olarak seçilmiştir. Enkapsülasyonun optimizasyonunda Design Expert 10 (Stat-Ease, MN, USA) paket programında cevap yüzey metodu (Box Behnken) kullanılmış ve sonuçlar ANOVA analizi ile değerlendirilmiştir.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Sodyum Aljinat Çözeltilerinin Viskozite Değerleri

Optimizasyonda kullanılan deneme desenine göre farklı oranlarda sodyum aljinat ile hazırlanan çözeltilerin viskozite değerleri 965 cP ve 5440 cP aralığında bulunmuştur. En düşük viskozite değeri 965 cP ile %1 sodyum aljinat içeren çözeltide tespit edilmişken, en yüksek viskozite değeri 5440 cP ile %2 sodyum aljinat içeren çözeltide tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar aljinat konsantrasyonunun elde edilen kapsüllerin şekillerinde oldukça etkili olduğunu, viskozite artışının aljinat küreciklerinin küreselliğe daha yaklaştırdığını ancak oldukça yüksek viskozite değerlerinde ise gözyaşı şeklinde küreciklerin

oluşturduğu bildirilmektedir (Bennacef vd. 2021). Başka bir çalışma da ise yine aljinat çözeltisinin viskozitesinin elde edilen kapsüllerin çapı üzerinde etkili olduğu, viskozitenin artması ile ortalama küre çapının azaldığı belirtilmiştir (Lee vd. 2013).

#### Aljinat Kürecikleri İşleminin Optimizasyonu

Nar suyunun kapsülasyonunda kullanılan sodyum aljinat çözeltisi farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ve kapsül oluşumunun gözlemlendiği değerler ile oluşturulan deneme desenine göre optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar SF değeri ( $\cong 1$ ), KD değeri

( $\cong 0$ ) ve toplam fenolik madde içeriği (en yüksek) kullanılarak belirlenmiştir.

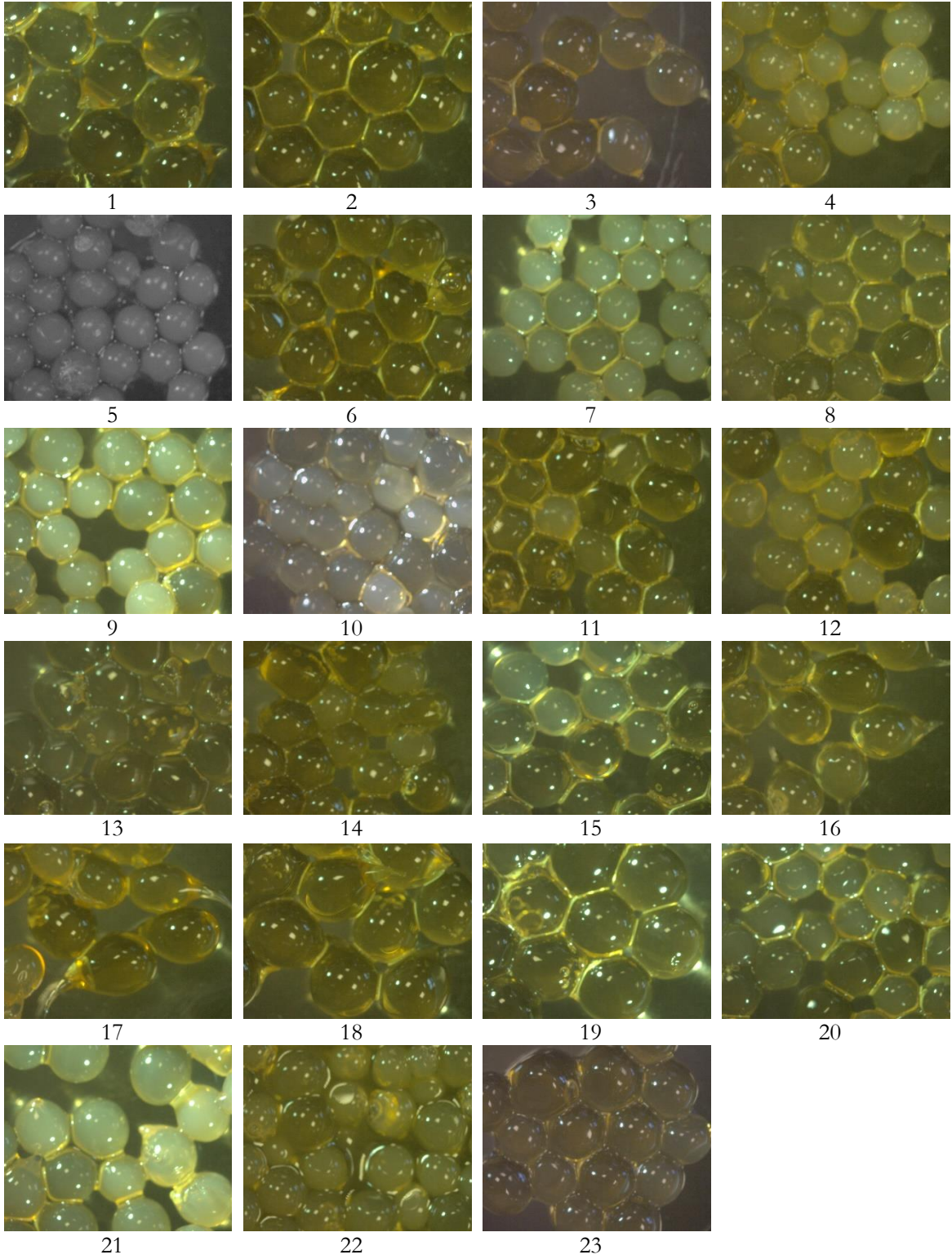
#### Aljinat Kürecikleri Proses Parametrelerinin Elde Edilen Kapsüllerin Boyutları ve Morfolojik Özelliklerine Etkisi

Mikrokapsüllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi için  $D_{min}$ ,  $D_{maks}$ ,  $D_{ort}$  değerleri ile şekil faktörü (SF) ve küresellik değerleri (KD) hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 2'de verilmiştir. Ayrıca aljinat kürecikleri ile elde edilen kapsüllerinin mikroskop görüntüleri Şekil 3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2. Aljinat kürecikleri ile elde edilen mikrokapsüllerin morfolojik özelliklerini veren  $D_{min}$ ,  $D_{maks}$ ,  $D_{ort}$ , SF ve KD değerleri

Table 2.  $D_{min}$ ,  $D_{maks}$ ,  $D_{mean}$ , SF and KD values that give the morphological characteristics of microcapsules obtained by the alginate beads

Run	$D_{min}$	$D_{maks}$	$D_{ort}$	SF	KD
1	56.82±0.88	74.48±1.65	61.39±0.71	0.74±0.03	0.13±0.01
2	48.77±0.94	50.09±0.82	49.11±0.90	0.87±0.00	0.01±0.00
3	48.14±0.84	68.78±2.79	52.00±0.52	0.74±0.01	0.17±0.01
4	41.57±0.45	42.69±0.41	42.13±0.44	0.85±0.00	0.01±0.00
5	36.40±0.19	36.41±0.12	36.40±0.12	0.86±0.00	0.00±0.00
6	45.30±2.16	60.32±0.85	51.61±0.59	0.75±0.01	0.14±0.02
7	37.20±0.33	40.11±0.16	39.20±0.19	0.86±0.01	0.04±0.01
8	43.58±0.40	45.14±0.89	44.59±0.81	0.84±0.01	0.02±0.01
9	42.60±0.61	43.71±0.88	43.04±0.69	0.86±0.00	0.01±0.01
10	40.16±1.15	41.95±0.86	40.80±0.99	0.86±0.01	0.02±0.01
11	43.54±1.74	45.62±1.76	44.40±1.76	0.84±0.01	0.02±0.01
12	40.17±0.76	42.19±0.67	43.01±0.37	0.86±0.01	0.02±0.00
13	39.50±0.74	42.43±0.29	41.78±0.19	0.83±0.02	0.04±0.01
14	41.94±0.35	44.04±0.41	43.37±0.44	0.87±0.00	0.02±0.00
15	43.71±0.67	45.75±1.21	44.56±0.92	1.38±0.30	0.02±0.01
16	47.03±1.09	76.94±1.34	55.52±0.69	0.68±0.00	0.24±0.00
17	35.00±8.77	106.75±5.80	62.32±2.36	0.51±0.02	0.77±0.10
18	59.35±0.36	90.50±2.39	67.01±0.46	0.68±0.02	0.21±0.02
19	60.92±0.65	64.45±1.21	63.82±1.13	0.85±0.01	0.03±0.00
20	39.26±0.54	42.95±1.18	43.14±1.31	0.87±0.00	0.04±0.01
21	48.93±1.77	61.08±0.86	52.54±0.05	1.21±0.01	0.11±0.02
22	38.10±0.39	38.63±0.41	38.37±0.37	0.99±0.06	0.02±0.00
23	45.22±0.75	47.59±0.71	47.36±0.60	0.87±0.00	0.03±0.01



Şekil 3. Box Behnken deneme deseninde aljinat kürecikleri ile elde edilen kapsüllerinin mikroskop görüntüleri

*Figure 3. Microscope images of capsules obtained by the alginate beads in Box Behnken design*

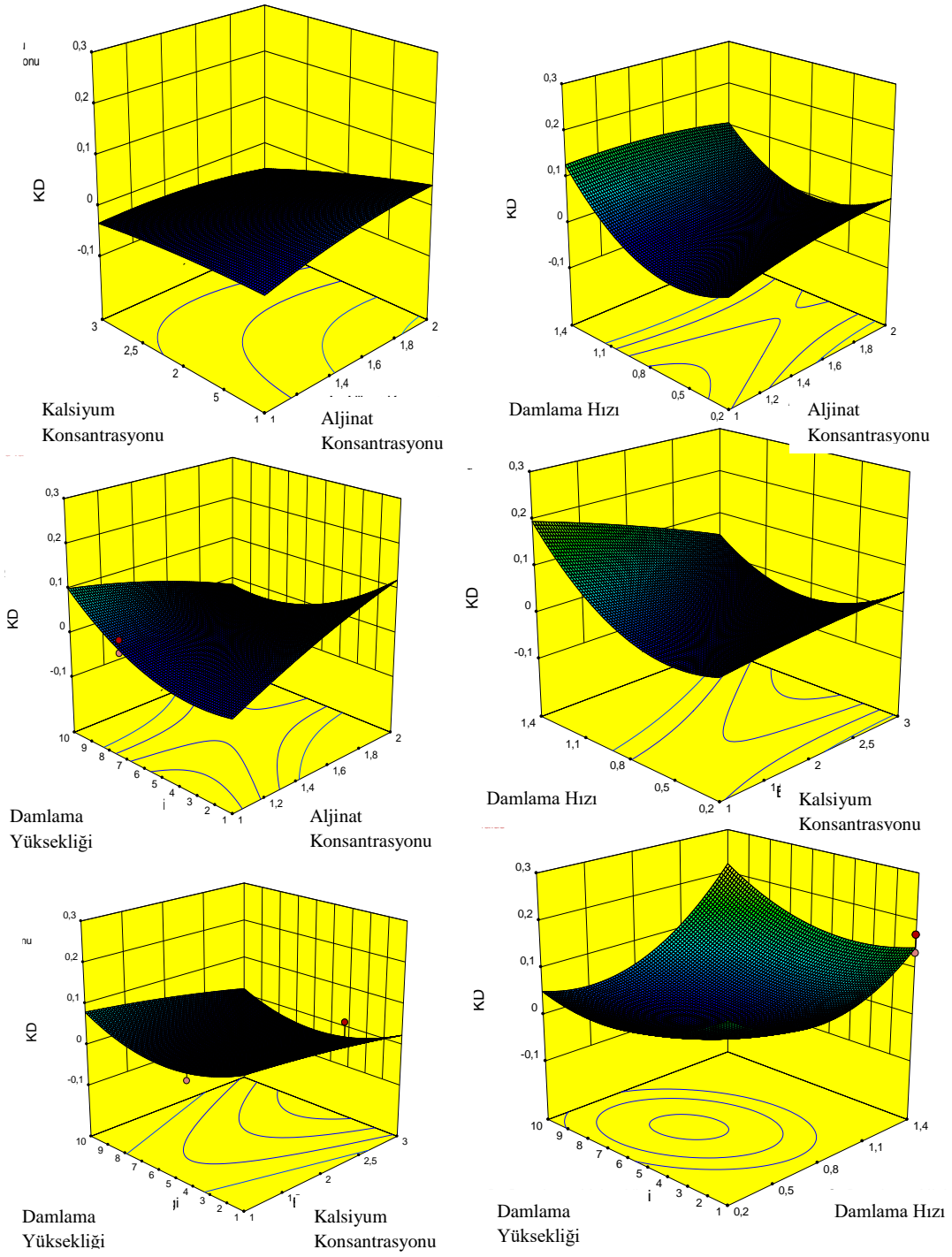
Elde edilen aljinat kapsüllerinin küreselliğe ne kadar yakın olduğunu gösteren SF değeri, 1'e ne kadar yakınsa kapsüllerin o kadar mükemmel bir küresellik gösterdiğini ifade etmektedir. Aljinat küreciklerinde kuyruk oluşumu söz konusu olduğunda ise SF değeri sifıra yaklaşmaktadır. SF değeri genellikle küresel ve elips şeklindeki partiküllerin tanımlamasında kullanılmaktadır. KD ise bir kürenin en uzun ve en kısa çaplarının oranı ile mükemmel bir kürenin değerini sifır olarak kabul etmekte iken bu değer 1'e yaklaştıkça kürenin şeklinin uzadığını ifade etmektedir. KD daha çok gözyaşı ve armut şeklindeki partiküller için kullanılmakta olup, KD değeri 0.05'den küçük partiküllerin küresel olduğu kabul edilmektedir (Lee vd. 2013). Nitekim yapılan çalışmalarda yüzey alanının difüzyon hızında etkili bir rol

oynadığı, küreselliğin sifıra yakın olması durumunun bir birim hacim başına daha az yüzey alanını ifade ettiği, böylece difüzyonun azalmasına etki ettiği bildirilmiştir (Morales vd. 2017, Piornos vd. 2017).

Aljinat kürecikleri ile elde edilmiş olan kapsüllerin bağımlı değişkenleri olan şekil faktörü ve küresellik değerlerine ait ANOVA analiz sonuçları Çizelge 3'de verilmiştir. ANOVA analiz sonuçlarına göre hem şekil faktörü hem de küresellik değerleri için model uyumsuzluğu önemsiz ( $p>0.05$ ), model ise önemli ( $p<0.05$ ) olarak bulunmuştur. Şekil faktörü ve küresellik değerlerine ait yanıt yüzey ve izohips eğrileri sırasıyla Şekil 4 ve 5'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. Bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren varyans ve regresyon analiz sonuçları  
 Table 3. Results of variance and regression analyzes showing the effect of independent variables

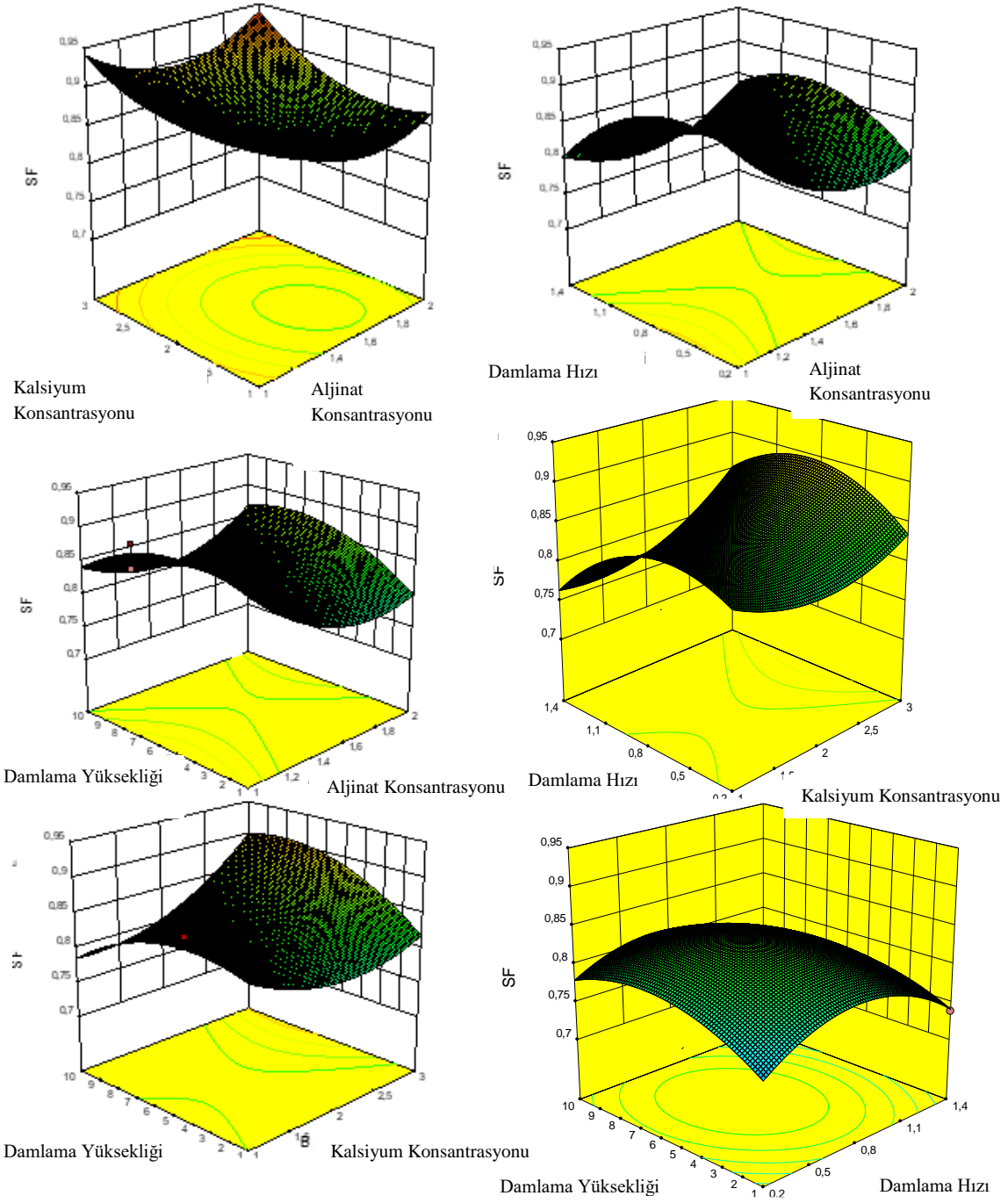
Varyasyon Kaynakları <i>Variation Source</i>	KD						
	SD <i>Standart Deviation</i>	Kareler Ortalaması <i>Mean Square</i>	p değeri <i>p-value</i>	SD <i>Standart Deviation</i>	Kareler Ortalaması <i>Mean Square</i>	p değeri <i>p-value</i>	SD <i>Standart Deviation</i>
Model	14	0.004	0.004	14	0.009	0.007	14
A	1	0.001	0.097	1	0.000	0.484	1
B	1	0.007	0.006	1	0.012	0.022	1
C	1	0.001	0.086	1	0.028	0.002	1
D	1	0.000	0.331	1	0.000	0.949	1
AB	1	0.000	0.193	1	0.002	0.251	1
AC	1	0.005	0.010	1	0.002	0.230	1
AD	1	0.004	0.021	1	0.026	0.003	1
BC	1	0.004	0.021	1	0.019	0.008	1
BD	1	0.009	0.003	1	0.000	0.807	1
CD	1	0.000	0.280	1	0.013	0.018	1
A <sup>2</sup>	1	0.008	0.004	1	0.000	0.509	1
B <sup>2</sup>	1	0.003	0.036	1	0.000	0.779	1
C <sup>2</sup>	1	0.008	0.004	1	0.022	0.005	1
D <sup>2</sup>	1	0.003	0.036	1	0.007	0.052	1
Kalıntı <i>Residual</i>	6	0.000		7	0.001		5
Model Uyumsuzluğu <i>Lack of Fit</i>	5	0.000	0.736	5	0.0017	0.266	3
			<u>Values</u>		<u>Values</u>		
R <sup>2</sup>			0.9326			0.9294	
Düzeltilmiş R <sup>2</sup> / <i>R<sup>2</sup>adj</i>			0.7987			0.7318	
Tahmin edilen R <sup>2</sup> / <i>R<sup>2</sup>pred</i>			0.7805			0.6283	



Şekil 4. Aljinat kürecikleri ile elde edilen nar suyu mikrokapsüllerinin küresellik değeri (KD) yanıt yüzey grafikleri

Figure 4. Response surface graphs of pomegranate microcapsules obtained by alginate bead for sphericity value (KD)





Şekil 5. Aljinat kürecikleri ile elde edilen nar suyu mikrokapsüllerinin şekil faktörü (SF) değeri yanıt yüzey grafikleri

Figure 5. Response surface graphs of pomegranate microcapsules obtained by alginate bead for shape factor value (SF)

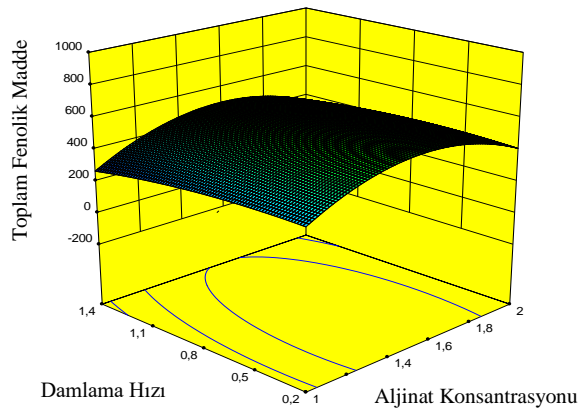
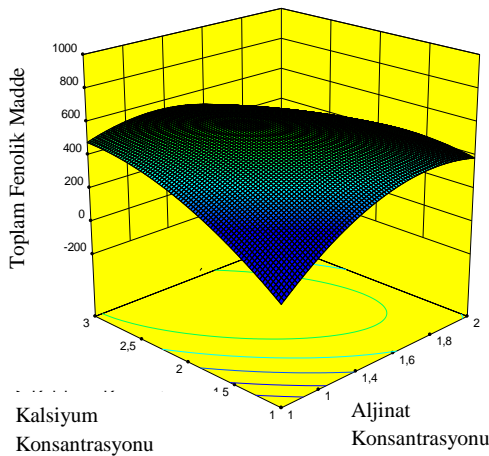
Şekiller incelendiğinde sabit kalsiyum konsantrasyonunda aljinat konsantrasyonunun artması ile damlacıkların küreselliğinin bozulduğu görülmektedir. Benzer şekilde aljinat konsantrasyonunun ve damlama hızının artması ile damlacıklar küresellikten uzaklaşarak damlacıklarda kuyruk oluşumu gerçekleşmiştir. Damlama hızı ve yüksekliğinin küreselliğe etkisi incelendiğinde ise her iki bağımsız değişkenin artması ile kapsüllerin şeklinin mükemmel küreselliğe yaklaştığı görülmüştür. Damlama yüksekliğinin kapsül şekline etkisi incelendiğinde aljinat konsantrasyonu artışından olumsuz etkilendiği, damlama hızının ise çok yüksek ya da çok düşük olduğu durumlarda yine şeklin bozulduğu gözlenmiştir.

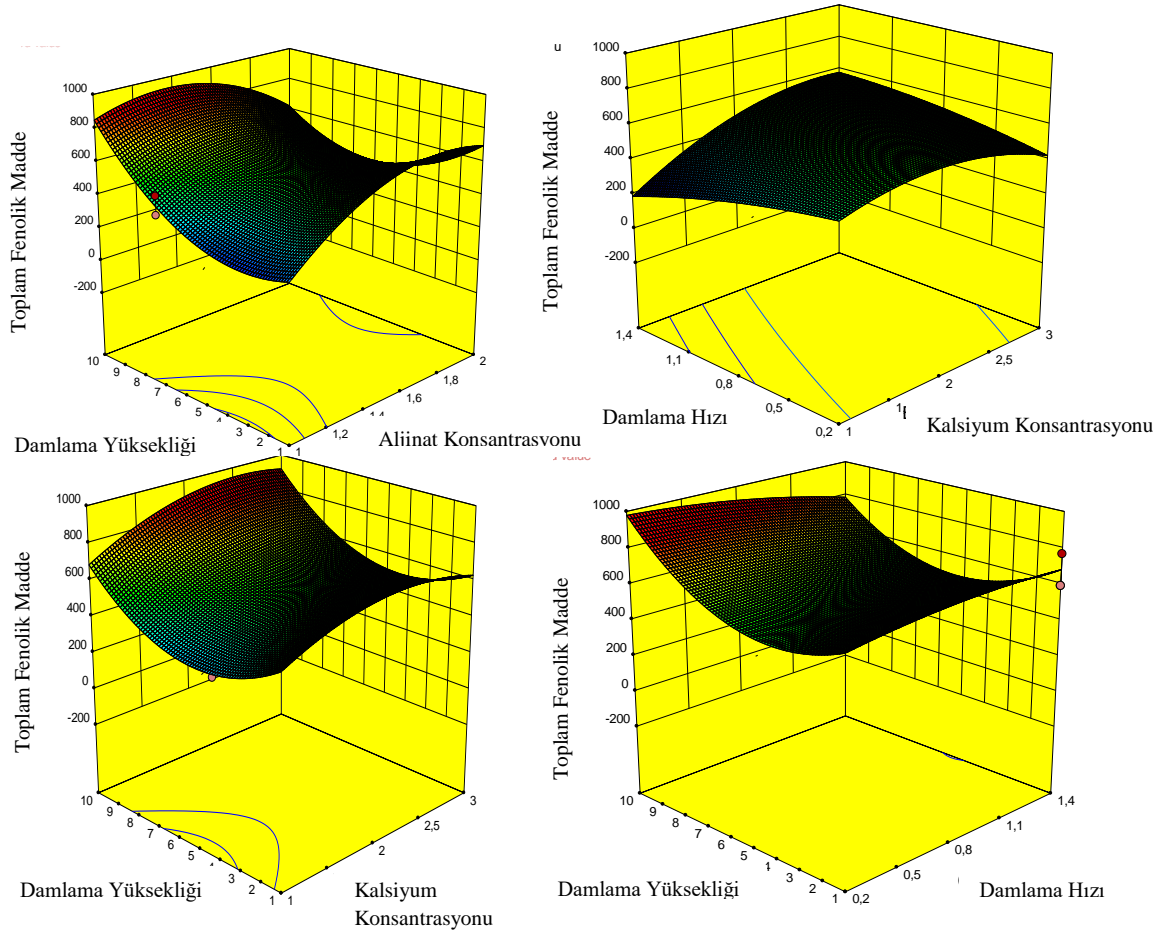
Aljinat kürecikleri yöntemi ile yapılan çalışmalar gün geçtikçe artış göstermektedir. Farklı ekipmanlar ile kullanılan tekniklerin yanı sıra basit laboratuvar ekipmanları ile de kapsüllerin oluşturulabilir olması ve aynı zamanda elde edilen kapsüllerin stabil olması birçok araştırmacının konu ile ilgilenmesini sağlamaktadır. Aljinat kürecikleri ile yağların mikrokapsülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada farklı damlama yükseklikleri (5, 15 ve 30 cm) ile farklı damlama hızlarının (30, 60 ve 90 mL/sa) küreselliğe etkileri araştırılmış ve sonuç olarak belirtilen damlama hızlarının küreselliğe istatistiksel olarak bir etkisinin olmadığı, ancak aljinat çözeltisinin damlama hızının artması ile küreselliğin sıfırdan uzaklaştığı bildirilmiştir. Çalışmada ayrıca küresel boncukların küresel olmayan boncuklara göre

daha stabil olduğu ve bağırsak sindiriminde mide sindirimine göre daha fazla yağın salındığı bildirilmiştir (Morales vd. 2017). Farklı tekniklerle aljinat kürecikleri üretimi üzerine yapılan bir çalışma kapsamında şırınga yardımı ile elde edilen aljinat küreciklerinde aljinat konsantrasyonunun artması ile kapsüllerin gittikçe deformasyona uğradığı, %3 ve %4 aljinat konsantrasyonlarında vizkozitenin artışı ile boncuk büyüklüğü dağılımının ve şeklinin bozulduğu belirtilmiştir (Prüsse vd. 2008)

### Aljinat Kürecikleri Proses Parametrelerinin Elde Edilen Kapsüllerin Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkisi

Aljinat kürecikleri işlemi ile elde edilen kapsüllerin toplam fenolik madde miktarlarına ait yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri Şekil 6'da, ANOVA analiz sonuçları ise Çizelge 3'de verilmiştir. Şekiller incelendiğinde aljinat kapsüllerinin oluşum süreci esnasında kalsiyum konsantrasyonu ile aljinat konsantrasyonunun azalmasının toplam fenolik madde miktarını azalttığı görülmektedir. Aljinat konsantrasyonu ile damlama yüksekliğinin etkisi incelendiğinde ise her iki değer azalışının kapsüllenen fenolik madde miktarında artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Damlama yüksekliğinin damlama hızıyla etkileşimini incelendiğinde ise damlama hızı ile birlikte damlama yüksekliğinin de azaldığı işlem koşullarında kapsüllenen toplam fenolik madde miktarının arttığı belirlenmiştir (Şekil 6).





Şekil 6. Aljinat kürecikleri yöntemi ile elde edilen nar suyu mikrokapsüllerinin toplam fenolik madde miktarı değeri yanıt yüzey grafikleri

Figure 6. Response surface graphs of pomegranate microcapsules obtained by alginate bead methods for total phenolic content

Aljinat kürecikleri ile elde edilen kapsüllerin özellikle sindirim sisteminde stabil olduğunun belirlenmesi nedeni ile biyoaktif bileşenlerin bu yöntem ile kapsüllemesinin çalışıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Biyoaktif içeriği oldukça yüksek olan natal eriğinin (*Carissa macrocarpa*) aljinat kürecikleri ile kapsüllediği bir çalışmada sonuçlar aljinat kürecikleri işleminin meyvede bulunan bileşenlerin stabilitesini arttırdığını ve aynı zamanda antosiyaninlerin salınımında önemli rol oynadığını göstermiştir (Seke vd. 2022). Tarçın esansiyel yağının aljinat kürecikleri ile kapsüllediği benzer bir çalışmada da yine elde edilen mikrokapsüllerin kontrollü salınım ve bağırsak sisteminde spesifik açılım için

oldukça iyi bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (Farahmand vd. 2022).

#### Teorik Olarak Belirlenen Optimum Koşulların Deneysel Olarak Doğrulanması

Nar suyu konsantrasyonu kullanılarak elde edilen aljinat küreciklerinin optimum işlem koşulları aljinat konsantrasyonu %1.6, kalsiyum konsantrasyonu %3, damlama hızı 0.77 ve damlama yüksekliği 10 cm olarak Design Expert 10 paket programı tarafından hesaplanmıştır. Optimum koşullarda üretilerek analiz edilen parametrelerin tahminlenen değerleri deneysel olarak doğrulanmış ve sonuçlar Çizelge 4'de verilmiştir. Tahminlenen değer ile deneysel veriler

arasında hata payı oldukça düşüktür. SF ve KD değerlerinin deneysel verileri sırasıyla %4.85 ve %1.00 oranında tahminlenen değerden yüksek iken TFM değeri %1.05 oranında tahminlenen

değerden düşük bulunmuştur. Nitekim bu değerlerin kabul edilebilir seviyede olduğunu söylemek mümkündür.

Çizelge 4. Nar suyu konsantresi kullanılarak elde edilen aljinat küreciklerinin optimizasyonunda deneysel ve teorik olarak elde edilen analiz sonuçları

Table 4. *Experimental and theoretical analysis results in the optimization of alginate beads obtained by using pomegranate juice concentrate*

	SF	KD	TFM (mg/100 g)
Teorik <i>Theoretical</i>	0.907	0.00	859.07
Deneysel <i>Experimental</i>	0.951	0.01	850.74
Farklılık (%) <i>Difference (%)</i>	4.85	1.00	1.05

## SONUÇ

Farklı biyoaktif bileşenlerin proses, taşıma ya da depolama sırasındaki stabilitesinin yanı sıra gastrointestinal sistemde kontrollü salınımı için farklı kapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır. Enkapsülasyonda kullanılan farklı tekniklerin proses koşulları (sıcaklık, besleme hızı, duvar/aktif materyal oranı vb) veya her bir yöntemde özgü kaplama materyali gibi parametreler işlem başarısını ve etkinliğini doğrudan etkilemektedir. Mikroorganizmaların immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan aljinat kürecikleri işlemi günümüzde farklı biyoaktif bileşenlerin, yağların veya aromaların kapsülasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır. Ancak aljinat kürecikleri yöntemindeki işlem koşullarının elde edilen kapsülün oluşumundan morfolojik özelliklerine ve hatta stabilitesine kadar etki ettiği bildirilmektedir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda kullanılan aljinat çözeltisinin damlacık yapısını oluşturamayıp kuyruklu uzayan bir yapıyla kapsülasyonun gerçekleşemediği belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen kapsülün boyutunda oldukça önemli bir faktör olarak tespit edilen damlama yüksekliği aynı zamanda kapsüllenen aktif materyalin miktarında da etkili olmaktadır. Çalışma sonuçları aljinat kürecikleri ile nar suyu konsantresinin kapsüllemesinde optimum koşulların aljinat konsantrasyonunun %1.6, kalsiyum konsantrasyonunun %3, damlama hızının 0.77 ve damlama yüksekliğinin ise 10 cm olduğunu göstermiştir. Bu çalışma ile sıvı formdaki farklı ürünlerin aljinat kürecikleri ile kapsülenerik

katma değeri yüksek mikrokapsüllerin elde edilebileceği görülmüştür.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmada nar suyu konsantresinin teminindeki desteklerinden dolayı MEYKON Meyve ve Kaynak Suları San. ve TİC. A.Ş.'ye teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

- Adams, L. S., Seeram, N. P., Aggarwal, B. B., Takada, Y., Sand, D., Heber, D. 2006. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 980-985.
- Aviram, M., Dornfeld, L. 2001) Pomegranate juice consumption inhibits serum angiotensin converting enzyme activity and reduces systolic blood pressure. *Atherosclerosis*, 158(1), 195-198.
- Balcı-Torun, F. 2019. Farklı enkapsülasyon yöntemleri kullanılarak elde edilen aroma kapsüllerinin depolama stabilitesinin ve gıda katkı maddesi olarak kullanımının araştırılması. *Akdeniz üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi, Antalya, Türkiye*, 182:
- Bennacef, C., Desobry-Banon, S., Probst, L., Desobry, S. 2021. Advances on alginate use for

- spherification to encapsulate biomolecules. *Food Hydrocolloids*, 118: 106782.
- Börner, R. A., Aliaga, M. T. A., Mattiasson, B., 2013. Microcultivation of anaerobic bacteria single cells entrapped in alginate microbeads. *Biotechnology letters*, 35, 397-405.
- Covarrubias, S. A., de-Bashan, L. E., Moreno, M., Bashan, Y., 2012. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(6), 2669-2680.
- Da Silva, T.L., Vidart, J.M.M., Da Silva, M.G.C., Gimenes, M.L., Vieira, M.G.A. 2017. Alginate and sericin: Environmental and pharmaceutical applications. *Biological activities and application of marine polysaccharides*: 57-86.
- Farahmand, A., Emadzadeh, B., Ghorani, B., Poncelet, D. 2022. Droplet-based millifluidic technique for encapsulation of cinnamon essential oil: Optimization of the process and physicochemical characterization. *Food Hydrocolloids*, 129: 107609.
- Hepaksoy, S., Pakyürek, M., Sürücü, A., Ak, B. E., Oğuz, H. İ., Hayoğlu, İ., ... Şaşkin, Z. M. N. 2023. Nar Yetiştiriciliği. *İksad Yayınları*, ss 31, Ankara, Türkiye.
- Koksoy, A., ve Kilic, M. 2004. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. *Food hydrocolloids*, 18(4), 593-600.
- Lee, B.B., Ravindra, P., Chan, E.S. 2013. Size and shape of calcium alginate beads produced by extrusion dripping. *Chemical Engineering & Technology*, 36 (10): 1627-1642.
- Leirvåg, I.T. 2017. Strategies for stabilising calcium alginate gel beads: Studies of chitosan oligomers, alginate molecular weight and concentration. NTNU, s.
- Li, D., Wei, Z., Xue, C. 2021. Alginate-based delivery systems for food bioactive ingredients: An overview of recent advances and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20 (6): 5345-5369.
- Morales, E., Rubilar, M., Burgos-Díaz, C., Acevedo, F., Penning, M., Shene, C. 2017. Alginate/shellac beads developed by external gelation as a highly efficient model system for oil encapsulation with intestinal delivery. *Food hydrocolloids*, 70: 321-328.
- Piornos, J.A., Burgos-Díaz, C., Morales, E., Rubilar, M., Acevedo, F. 2017. Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation. *Food Hydrocolloids*, 63: 139-148.
- Prüsse, U., Bilancetti, L., Bučko, M., Bugarski, B., Bukowski, J., Gemeiner, P., Lewińska, D., Manojlovic, V., Massart, B., Nastruzzi, C. 2008. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*, 62: 364-374.
- Ramdhan, T., Ching, S.H., Prakash, S., Bhandari, B. 2020. Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. *Trends in Food Science & Technology*, 106: 150-159.
- Šavikin, K., Nastić, N., Janković, T., Bigović, D., Miličević, B., Vidović, S., Menković, N., Vladić, J. 2021. Effect of type and concentration of carrier material on the encapsulation of pomegranate peel using spray drying method. *Foods*, 10 (9): 1968.
- Seke, F., Manhivi, V.E., Slabbert, R.M., Sultanbawa, Y., Sivakumar, D. 2022. In vitro release of anthocyanins from microencapsulated natal plum (*Carissa macrocarpa*) phenolic extract in alginate/psyllium mucilage beads. *Foods*, 11 (17): 2550.
- Selimoglu, S.M., Elibol, M. 2010. Alginate as an immobilization material for mAb production via encapsulated hybridoma cells. *Critical reviews in biotechnology*, 30 (2): 145-159.
- Shukla, M., Gupta, K., Rasheed, Z., Khan, K. A., Haqqi, T. M. 2008. Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. *Journal of Inflammation*, 5(1), 9.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonić, M., Knez, Ž. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in

some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 89 (2): 191-198.

Toprakçı, İ., Torun, M., Torun, F. B., Şahin, S., 2022. Alginate-based hydrogels for trapping the polyphenols of Hibiscus sabdariffa: use of a statistical experimental design approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11.

Vold, I.M.N., Kristiansen, K.A., Christensen, B.E. 2006. A study of the chain stiffness and extension of alginates, in vitro epimerized alginates, and periodate-oxidized alginates using size-exclusion chromatography combined with light scattering and viscosity detectors. *Biomacromolecules*, 7 (7): 2136-2146.

Woo, J.-W., Roh, H.-J., Park, H.-D., Ji, C.-I., Lee, Y.-B., Kim, S.-B. 2007. Sphericity optimization of

calcium alginate gel beads and the effects of processing conditions on their physical properties. *Food Science and Biotechnology*, 16 (5): 715-721.

Yamdech, R., Aramwit, P., Kanokpanont, S. 2012. Stability of anthocyanin in mulberry fruits extract adsorbed on calcium alginate beads. In International Conference Chulalongkorn University, Bangkok Thailand.

Yekdane, N., Goli, S.a.H. 2019. Effect of pomegranate juice on characteristics and oxidative stability of microencapsulated pomegranate seed oil using spray drying. *Food and Bioprocess Technology*, 12: 1614-1625.



**AFYONKARAHİSAR İLİNDE YEREL MARKETLERDEN TOPLANAN  
CORYLUS AVELLANA (FINDIK) ÖRNEKLERİNDEN FUNGUS İZOLASYONU,  
AFLATOKSİN VE OKRATOKSİN A MİKTARININ BELİRLENMESİ**

**Arzu ÖZKARA\***

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyonkarahisar,  
Türkiye

Geliş/Received: 02.05.2024; Kabul /Accepted: 16.08.2024; Online baskı /Published online: 03.09.2024

Özkara, A. (2024). Afyonkarahisar ilinde yerel marketlerden toplanan *Corylus avellana* (findık) örneklerinden fungus izolasyonu, aflatoksin ve okratoksin a miktarının belirlenmesi. GIDA (2024) 49 (5) 820-832 doi: 10.15237/gida.GD24048

Özkara, A. (2024). Fungus isolation, determination of aflatoxin and ochratoxin a from *Corylus avellana* (hazelnut) samples collected from local markets in Afyonkarahisar province. GIDA (2024) 49 (5) 820-832 doi: 10.15237/gida.GD24048

**ÖZ**

Çalışmamızda Afyonkarahisar'da rastgele 20 farklı marketten alınan findık örnekleri aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1), aflatoksin G2 (AFG2, toplam aflatoksin (AF) ve okratoksin A (OTA) içerikleri bakımından Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile incelenmiştir. Ayrıca örneklerdeki fungal kontaminasyonu belirlemek amacıyla, fungus izolasyonu yapılarak genus seviyesinde sınıflandırılmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre iki lokalite dışında kalan tüm bölgelerdeki findık örneklerinden fungus izole edilmiştir. Aflatoksin taramalarında merkez 5. örneklem alanında 1.8070 ng/ml AFG1 en yüksek aflatoksin miktarı olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde tespit edilen aflatoksin miktarları Türk Gıda Kodeksi sınırlarını aşmamıştır. Dolayısıyla yapılan çalışma ile findık örneklerinde yüksek potansiyel bir risk tespit edilmemiştir. Ancak potansiyel risk değerlendirmesinin yapılabilmesi için; az miktarlarda aflatoksin ve okratoksin varlığının çeşitli gıdalarla vücuda alınarak uzun vadede karaciğerde birikme ihtimali açısından da değerlendirilmesi gerekmekte olup, bu çalışma ileri çalışmalar için bir temel oluşturmaktadır. Ayrıca daha önce bu konuda Afyonkarahisar'da yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Aflatoksin, *Corylus avellana*, fungal kontaminasyon, okratoksin

**FUNGUS ISOLATION, DETERMINATION OF AFLATOXIN AND  
OCHRATOXIN A FROM *Corylus avellana* (HAZELNUT) SAMPLES COLLECTED  
FROM LOCAL MARKETS IN AFYONKARAHİSAR PROVINCE**

**ABSTRACT**

In our study, hazelnut samples taken randomly from 20 different markets in Afyonkarahisar were evaluated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for their aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1), aflatoxin G2 (AFG2), total aflatoxin (AF) and ochratoxin A (OTA) contents. In addition, in order to determine the fungal contamination in the samples, fungus was isolated and classified at the genus level. According to the results obtained, the fungus was

\* Sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: arzuozkara@gmail.com

☎: (+90) 505 224 8766

Arzu Özkara; ORCID no: 0000-0002-7815-5366

isolated from hazelnut samples in all regions except two localities. 1.8070 ng/ml AFG1 was found to be the highest aflatoxin amount in the central 5th sampling area. When the data obtained was evaluated, the detected aflatoxin amounts did not exceed the Turkish Food Codex limits. Therefore, no high potential risk was detected in the hazelnut samples in the study. However, in order to make a potential risk assessment; even if aflatoxin and ochratoxin are present in small amounts, they should be evaluated for the possibility of being taken into the body with various foods and accumulating in the liver in the long term, and this study will be the basis for future studies. Additionally, there has been no previous study on this subject in Afyonkarahisar.

**Keywords:** Aflatoxin, *Corylus avellana*, fungal contamination, ochratoxin

### GİRİŞ

Günümüzde endüstriyel ilerlemelerle birlikte insanlar ve diğer tüm canlılar çevreden gelen çeşitli kimyasallara daha fazla maruz kalmaktadır. Bu kaynaklardan biri de doğal kimyasal kirleticilerin yüksek oranda olduğu gıdalardır (Wu vd., 2014; Kafouris vd., 2017; Cunha vd., 2018). Gıda maddelerinde oluşabilen küfler ve bunların metabolitleri günümüzde halk sağlığını tehdit etmenin yanı sıra ciddi ekonomik kayıplara da neden olmaktadır. Pek çok gıda maddesi satışa çıkarılmadan küflerle kontamine olarak bozulmakta, gözle görülür bir bozulma göstermeyen ürünler ise içerdikleri sekonder metabolitler nedeniyle halk sağlığını tehdit edebilmektedir.

Funguslar tarafından üretilen mikotoksinler, insan ve hayvan sağlığı açısından ciddi riskler oluşturan düşük molekül ağırlıklı toksik bileşiklerdir (Baquião vd., 2016). Bu kirletici maddeler, dünya çapındaki tüm gıda maddelerinin kalitesine yönelik kritik bir tehdit oluşturdıklarından son yıllarda dikkat çekici bir konu olmaktadır (Borchers vd., 2010; Wu vd., 2014; Tolosa vd., 2013; Kafouris vd., 2017; Yu-jiao vd., 2018). Avrupa Birliği'ne göre (Komisyon Yönetmeliği 2006), gıda ve yemdeki en önemli mikotoksinler; okratoksin A (OTA); aflatoksinler (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2); fumonisinler; trikotesen ve zearalenon (Varga vd., 2013)'dur. AF'ler ve OTA, mikotoksinler arasında en yaygın kirleticilerdir (Asghar vd., 2016, Toptaş ve Erköse, 2023).

Başta *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* olmak üzere farklı *Aspergillus* türleri tarafından doğal olarak üretilen AF'ler, insanlarda hepatik ve ekstrahepatik karsinogeneze neden olan mutajenik, teratojenik ve kanserojen mikotoksinler olarak önem taşımaktadır

(Hontayana vd., 2015). Yapılarına göre 20'den fazla AF türü bulunmaktadır. Aflatoksinlerin en yaygın formları olan B1 (AFB1), B2, G1 ve G2 yüksek toksisiteye sahiptir. AF'ler, Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC 1993) tarafından grup 1 kanserojen olarak sınıflandırılmakta olup, ayrıca mutajen, kanserojen ve immünotoksiktirler (Moss, 1998). İnsanlar, daha önce bu kimyasallara maruz kalmış hayvanlardan elde edilen hayvansal ürünleri tüketerek veya kontamine olmuş gıdaları doğrudan yiyerek aflatoksinlere maruz kalmaktadır (Hammami vd., 2014). Dünya çapında, başta pirinç, buğday, baharatlar, kurutulmuş meyveler, mısır ve sert kabuklu yemişler olmak üzere çeşitli tarım ürünlerinde AF kontaminasyonu rapor edilmiştir. (Grajewski vd., 2012; Prella vd., 2012; Nguyen ve Ryu, 2014; Hepsağ ve Hayoğlu, 2022; Var ve Tekin, 2023; İnanç, 2024). Bileşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nun bildirdiğine göre dünya tarım ürünlerinin %25'i mikotoksinlerle kontamine olmuştur (Anonymous, 2021). Bu bağlamda önemli besin ürünlerinde bulunabilecek aflatoksinlerin belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması pek çok risk faktörünü ortadan kaldırabilir.

Ayrıca Okratoksin A (OTA), *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* ve *Aspergillus carbonarius* gibi mantar türleri tarafından üretilen doğal olarak oluşan mikotoksin bileşimidir (Cary ve Ehrlich, 2006). Ayrıca OTA'nın tahıllar, baharatlar, yeşil kahve, bürülce, kuruyemişler, şarap, bira, kurutulmuş meyveler, üzüm ve üzüm suyu gibi çeşitli gıdalarda da kirletici olduğu belirtilmektedir (Belli vd., 2005; Chulze vd., 2006; Gonzalez vd., 2006; Ghali vd., 2020; Afolabi vd., 2020). OTA, IARC tarafından Grup2B kanserojen olarak sınıflandırılmıştır ve hayvanlarda kanserojen potansiyele sahip bir nefrotoksindir (IARC, 1993).



Dolayısıyla okratoksinlerin farklı besin maddelerindeki varlıklarının belirlenmesi ve gerekli önlemleri alınması noktasında önem taşımaktadır. Çünkü olumsuz koşullar altında gıda maddelerinde fungusların çoğalmasıyla mikotoksin gibi istenmeyen sekonder metabolitler gıdalarda birikerek bu gıda maddeleriyle beslenen tüm canlılarda farkında olmadan ciddi riskler oluşturabilmektedirler.

Kuru meyveler ve kuruyemişler esansiyel amino asitler, mineraller, vitaminler ve diyet lifi açısından zengindir ve her yaşta insan tarafından sevilir. Kronik hastalığı olan kişiler için bu ürünler aynı zamanda güç ve enerji sağlayan besin takviyeleri olarak da kullanılmaktadır (Emilio, 2010). Kuruyemişler % 60-70 yağ ve % 17 protein içeriğiyle yüksek besin değerine sahiptir ve önemli miktarda fenolik bileşikler, amino asitler, yağ asitleri ve antioksidanlar içerir. Fındık tüketimi kalp-damar hastalıkları, safra taşları, obezite ve kilo alma gibi sağlık sorunlarının önlenmesinin yanı sıra özellikle kadınlarda diyabet riskinin azaltılması açısından da önemlidir (Blomhoff vd., 2006; Yang, 2009) Fındık genellikle nemli bölgelerde yetişmektedir, bu nedenle fungus kontaminasyonu ile toksijenik aflatoksin (AF) üretimine maruz kalırlar (Elzupir ve Alamer, 2015; Adetunji vd., 2018). Çalışmamızda fındık tercih edilmesinin başlıca sebebi kültürel olarak Türkiye'deki başlıca çerez gruplarının arasında yer alması ve nemli bölgelerde yetişmesi sebebiyle, depolanması sırasında olumsuz koşullarla karşılaşılma potansiyelinin yüksek olması, ayrıca satışa sunulduğu yerlerdeki rafta kalma sürelerinin de potansiyel risk oluşturabileceğinin düşünülmesidir.

Türkiye'de fındıklarda AF'lerin ve OTA kontaminasyonunun varlığına ilişkin çok az veri bulunmaktadır. Afyonkarahisar'da satışa sunulan fındıklarda aflatoksin ve okratoksin varlığına ilişkin ise daha önce yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda Afyonkarahisar ve ilçelerdeki rastgele 20 farklı marketten alınan fındık örnekleri belirlenerek fungus kontaminasyonu, aflatoksin ve okratoksin miktarları açısından incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda AF miktarlarını ölçmek için HPLC kullanılmıştır.

### MATERYAL METOT

#### Örnekler

Afyonkarahisar ve ilçelerindeki rastgele 20 farklı lokal marketten 100'er adet kavrulmuş fındık örneği satın alındı. Laboratuvara getirilen örnekler deney yapılana kadar +4 °C buzdolabında saklandı. Numunelerin tamamı blender kullanılarak homojenize edilecek şekilde öğütüldü ve analize kadar plastik torbalar içerisinde buzdolabında saklandı. Homojenize edilen tüm numuneler, ürünün raf ömrü dikkate alınarak çok fazla bekletilmeden analiz edildi.

#### Örneklerin Hazırlanması

Fındık örneklerinden AF'lerin ekstraksiyonu ve IAC (immünoafinite kolonu) temizliği AOAC Resmi Yöntemi 999.07'nin (Stroka vd., 2000) değiştirilmiş prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. 50 gr numune, 4 gr sodyum klorür (NaCl), 150 ml metanol ve 100 ml deiyonize H<sub>2</sub>O blendera konularak yüksek hızda 1 dakika karıştırılarak numuneler homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bu karışım whatman no:4 filtre kâğıdından süzümüştür. Elde edilen süzütüden 5 ml alınmış ve üzerine 15 ml PBS (fosfat tampon solüsyonu) eklenip vortekslenmiştir. İmmünoafinite kolondan sırasıyla oluşan bu karışımın tamamı (20 ml) ve 20 ml deiyonize saf su 3 ml/dk akış hızı ile geçirilmiş ve kolon hava geçirilerek kurutulmuştur. Aflatoksin ve okratoksin elüsyonu için önce immünoafinite kolondan 1 damla/saniye olacak şekilde 1 ml methanol ardından yine aynı hızda 1ml su geçirilerek toplamda 2 ml ekstrakt (HPLC ye verilmeye hazır) elde edilmiştir. Bu ekstraktlar HPLC analizi yapılmaya kadar 4-8 °C'de tutulmuştur. OTA analizleri içinde aynı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

#### HPLC Koşulları

Numuneler, bir floresans detektörü ile ODS-3 (C/N 4 µm, 3.9 x 150 mm) ters faz kolonuna sahip bir ters faz izokratik modda HPLC (Shimadzu RF-20A / LC20AD / DGU-20A<sub>3R</sub> / CTO-10AS VP) kullanılarak analiz edilmiştir. AF analizi için mobil faz, 0.12 g/L potasyum bromit

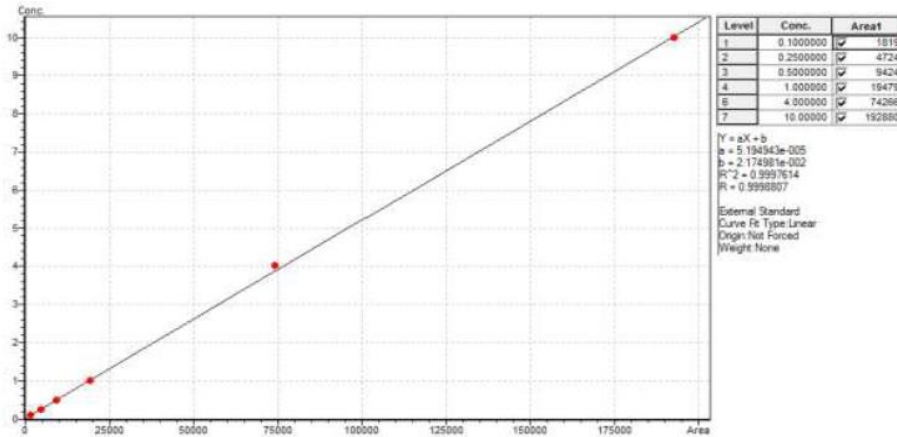
ve 350 µl/L nitrik asit (4 M) içeren su-asetonitril-metanol (6:2:3, v/v/v) karışımı olup ve akış hızı 1 ml dk<sup>-1</sup>'dir. OTA analizi için mobil faz ise, 0.12 g/L potasyum bromit ve 350 µl/L nitrik asit (4 M) içeren su-asetonitril-metanol (6:2:3, h/h/v) karışımıdır ve akış hızı 1 ml dk<sup>-1</sup>'dir.

HPLC kolon sıcaklıkları AF analizleri için 30 °C'de ve OTA analizleri için 40 °C'de tutulmuştur. Floresans dedektör, AF analizleri için 365 nm eksitasyon dalga boyuna ve 442 emisyon dalga boyuna, OTA analizleri için 333 nm eksitasyon dalga boyuna ve 460 emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır (Hepsag vd., 2014). Her iki analiz için de HPLC enjeksiyon hacmi 25 µl olarak alınmıştır. AF analizlerinde aflatoksinlerin

alınma süreleri (dakika); G2 için 4.982, G1 için 5.994, B2 için 6.710, B1 için 8.189 olarak tespit edilmiştir. OTA analizi için ise alınma süresi 8.549 dk olarak belirlenmiştir.

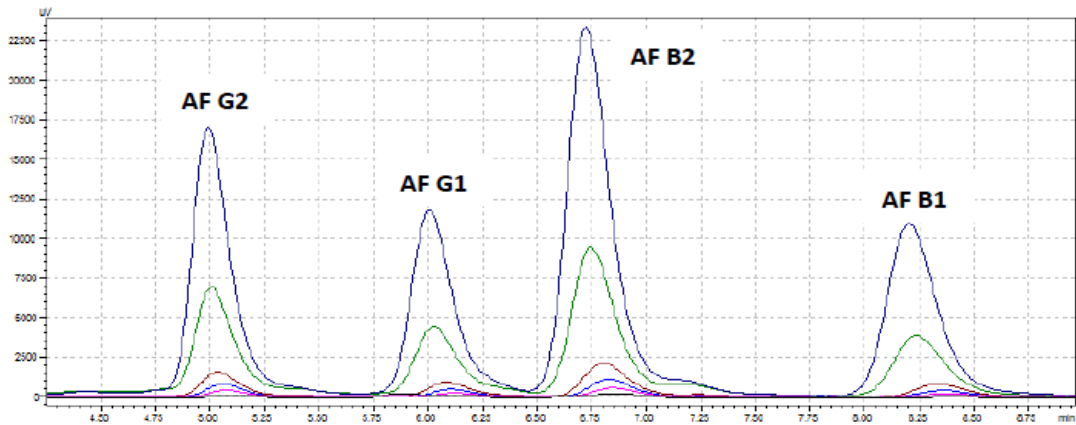
Hem AF analizlerinde hem de OTA analizlerinde hazırlanan örnekler ve standartlar kolon sonrası KOBRA® CELL TAMSON cihazında türevlendirme işlemine tabi tutularak floresans detektöre iletilmiştir.

Aflatoksin ve Okratoksin A miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart çözeltilere ait kalibrasyon eğrileri ve HPLC kromotogramları Şekil 1, 2, 3 ve 4'de verilmiştir.



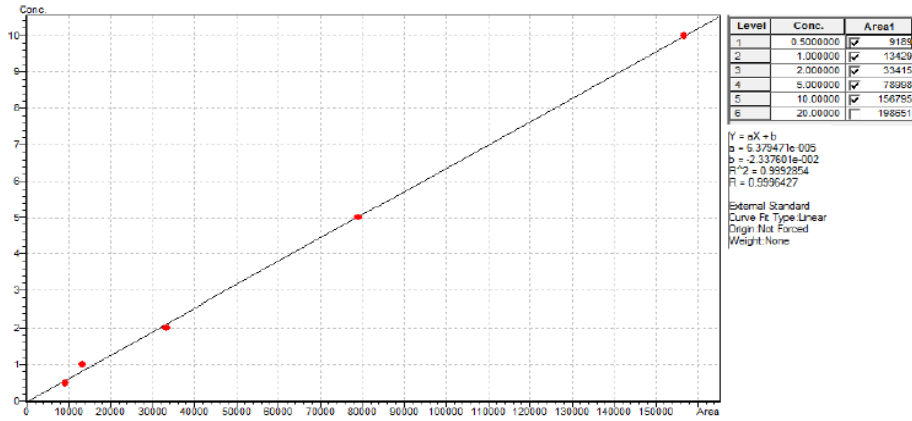
Şekil 1. Aflatoksin miktarlarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi

Figure 1. Calibration curve to determine aflatoxin amounts

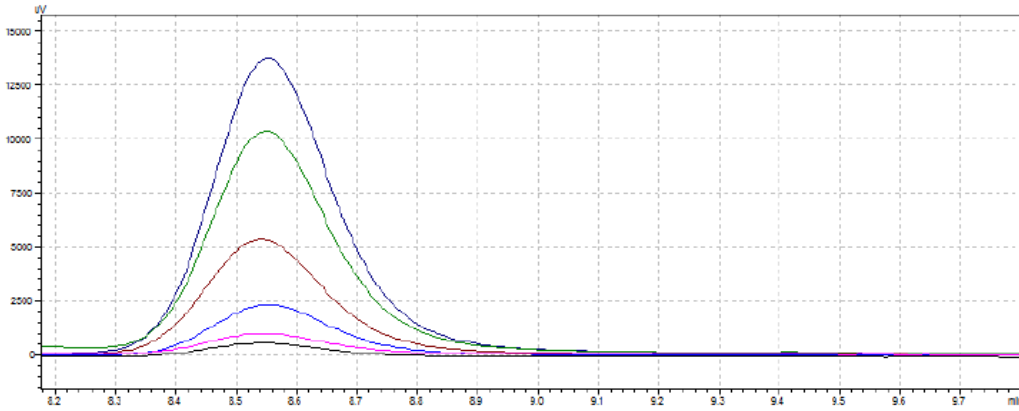


Şekil 2. Aflatoksin miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart çözeltilere ait HPLC kromotogramlarının karşılaştırılması.

Figure 2. Comparison of HPLC chromatograms of standard solutions used in determining aflatoxin amounts



Şekil 3. Okratoksin-A miktarlarının belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi  
 Figure 3. Calibration curve used to determine ochratoxin-A amounts



Şekil 4. Okratoksin-A miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart çözeltilere ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması

Figure 4. Comparison of HPLC chromatograms of standard solutions used in determining ochratoxin-A amounts

### Analytik Kalite Parametreleri ve Validasyon Prosedürleri

HPLC'nin tespit ve miktar belirleme limiti (LOD/LOQ) için, AF karışımında 0.1, 0.25, 0.50, 1, 5, 10 ve 20 ng ml<sup>-1</sup> ve OTA'da 0.5, 1, 5, 10 ve 20 ng ml<sup>-1</sup> standart çözeltileri kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi ve denklemleri hazırlanmıştır. Blank'in herhangi bir sinyal üretmediği göz önüne alınarak

LOD ve LOQ şu şekilde hesaplandı:

$$LOD = 3 \times \text{Standart sapma} / \text{Eğim.} \quad (1)$$

$$LOQ = 3 \times LOD \quad (2)$$

Yukarıdaki denklemlere dayanarak aflatoksinlere ilişkin LOD ve LOQ değerleri Çizelge 1'de gösterilmektedir.

### Fungus İzolasyonu

Laboratuvara getirilen numuneler steril poşetlerinden çıkarıldıktan sonra her numune alanı için 100 gram numune tartılarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Numuneler tartıldıktan sonra yüzey sterilizasyonunun sağlanması için % 0.4'lük sodyum hipoklorit solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir. Yüzeyi sterilize edilen numuneler, sodyum hipoklorit çözeltisini uzaklaştırmak için steril distile su ile birkaç kez durulanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan numuneler havan tokmağı yardımıyla steril torbalara konularak toz haline getirilmiştir. 1 g toz fındık örneğine 100 ml steril distile su ilave edildi ve bu karışım vortekslenmiştir. Daha sonra bu karışımın 1 ml'si Rose Bengal Chloramphenicol Agar'a

(RBCA) eklenmiştir. Örnekleme, tüm lokasyonlarda en az 5 tekrar ve 3 bağımsız deney ile gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılmış petrieller fungus kolonilerinin büyümesi açısından karanlıkta oda sıcaklığında (25 °C) 7-14 gün

süreyle inkübe edilmiştir. Her istasyon için alınan örnekler petri kaplarında sayılmış ve mL başına ortalama mantar sayısı CFU (koloni oluşturan birim) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 1. HPLC analizi ile aflatoksin tayininin doğrulanması  
Table 1. Confirmation of aflatoxin determination by HPLC analysis

Aflatoksin Okratoksin <i>Aflatoxin Ochratoxin</i>	LOD (µg/kg) <sup>d</sup>	LOQ (µg/kg) <sup>q</sup>	Kalibrasyon Eğrisi <sup>c</sup> <i>Calibration Curve</i>	R <sup>2</sup>
AFB1	0.01	0.03	Y=16032x+1390.3	0.9979
AFB2	0.01	0.03	Y=34841x-3982.4	0.9983
AFG1	0.01	0.03	Y=14218x+2200.6	0.9982
AFG2	0.01	0.03	Y=21458x-3884.8	0.9967
OTA	0.05	0.16	Y=14448x+2521.4	0.9970

c;x: aflatoksin ve okratoksin konsantrasyonu (µg/kg)- y: yoğunluk, d: Tespit sınırı (LOD), q: Kantifikasyon sınırı (LOQ)

c;x: aflatoxin and ochratoxin concentration (µg/kg)- y: density, d: limit of detection (LOD), q: limit of quantification (LOQ)

### Fungusların İdentifikasyonu

RBCA'da yetiştirilen fungus kolonileri 7-14 günlük inkübasyonun ardından identifikasyon amacıyla farklı besiyerlerine (Patato Dextrose Agar, Sabouraud Glucose Agar, Czapek-dox Agar, Malt Extract Agar) pasajlanmıştır. Türlerin tanımlanması için koloniler makroskobik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. İdentifikasyon cins düzeyinde gerçekleştirilmiş ve cinslerin tanımlanması Barnett ve Hunter (1998)'a göre yapılmıştır. Fungusların mikroskobik incelemesinde Butler ve Mann (1959)'ın selüloz bant yöntemi kullanılmış ve boyama laktofenol pamuk mavisi ile yapılmıştır.

### SONUÇ

Afyonkarahisar ili ve ilçelerinde bulunan 20 farklı lokal marketten toplanan fındık örneklerinden fungus izolasyonu gerçekleştirilmiş ayrıca aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1), aflatoksin G2 (AFG2), toplam aflatoksin (AF) ve okratoksin (OTA) içerikleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile incelenmiştir.

Elde edilen veriler incelendiğinde iki lokalite dışında tüm bölgelerden fungus izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Her örneklem alanından ortalama koloni sayıları tespit edilmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında merkez 5. örnek alanında tüm lokalitelerden daha fazla koloni sayısı tespit

edilmiştir. Bu lokasyonda tespit edilen kolonilerin ortalama sayısı 14.66±0.26 CFU/ml olmuştur. Ayrıca bu örneklem alanında *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* olmak üzere dört farklı cins fungus tespit edilmiştir. Bunu takip eden ortalama koloni sayısı ise merkez 2. örneklem bölgesi olmuştur ve örneklem bölgesinde *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* olmak üzere üç farklı cins tespit edilmiştir. Tüm örneklem bölgeleri arasında en az ortalama koloni sayısı merkez 8. ve Sultandağı 3. örneklem alanında tespit edilmiştir. Toplanan fındık örneklerinden elde edilen fungus kolonileri bakımından lokaliteler arasında küçük farklılıklar olmasına rağmen tüm bölgelerden izole edilen fungus cinsleri *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* ve *Polystanum* gibi bazı temel fungal türler ile temsil edilmektedir.

Çalışma örneklerinin aflatoksin ve OTA analizi sırasında bazı örneklem bölgeleri tespit sınırının altında kalmıştır. Aflatoksin taramalarında, en yüksek aflatoksin miktarı merkez 5. örneklem alanında 1.8070 ng/ml AFG1 olarak bulunmuştur. İkinci yüksek aflatoksin değeri ise merkez 3. örneklem alanında 1.4575 ng/ml AFG1 ile temsil edilmiştir. En düşük veri ise merkez 4. örneklem alanında 0.1000 ng/ml ile AFB2 olmuştur. Diğer örnek alanlarından farklı olarak merkez 1. ve 7. örneklem alanlarında tüm aflatoksin çeşitleri (AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2) belirlenebilmiştir. Bölgelere göre izole

## A. Özkara

edilen mantarların cins ve sayıları ile AF'ler ve OTA düzeyleri Çizelge 2'de verilmiştir. Okratoksin tarama sonuçlarında ise iki bölgesel örnek dışında değerler tespit sınırının altında kalmış merkez 1. örneklem ve Şuhut 1. örneklem bölgesinde 5 ng/ml'nin altında OTA değeri tespit

edilmiştir. TGK'nin belirlediği limitler tüketime yönelik üretilen fındıklarda AFB1 için 5 ng/g ve toplam AF için 10 ng/g'dır. Örnek alanlardan alınan bazı fındıklarda farklı miktarlarda aflatoksin tespit edilmesine rağmen hiçbir örnek alanda TGK limitlerini aşan bir örneğe rastlanmamıştır.

Çizelge 2. Örneklem alanlarındaki fındık örneklerinde bulunan fungus, AF'ler ve OTA düzeyleri

Table 2. Fungi, AFs and OTA levels in hazelnut samples from sampling areas

Örnek Alanı Sample Area	Ortalama Koloni Sayısı (CFU/ml) Colony Forming Unite (CFU/ml)	Fungus Cinsleri Fungal Species	AFB1 (ppb, ng/ml)	AFB2 (ppb, ng/ml)	AFG1 (ppb, ng/ml)	AFG2 (ppb, ng/ml)	Toplam AF (ppb, ng/ml)	OTA (ppb, ng/ml)
M1	2.66±0.02	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i>	0.2601	0.3098	0.2287	0.2449	1.0435	< 5
M2	4.46±0.03	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i>	0.1795	0.3843	1.2299	*	1.7937	*
M3	2.33±0.05	<i>Aspergillus</i>	*	0.3732	1.4575	*	1.8307	*
M4	1.33±0.06	<i>Aspergillus</i>	*	0.1000	*	*	0.1000	*
M5	14.66±0.26	<i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Cladosporium</i>	0.1976	0.4273	1.8070	*	2.4319	*
M6	1.33±0.08	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i>	*	*	*	*	*	*
M7	2.66±0.03	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i>	0.2289	0.1733	0.2108	0.1527	0.7657	*
M8	0.33±0.02	<i>Aspergillus</i>	*	*	*	*	*	*
M9	1.33±0.06	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i>	*	*	*	*	*	*
M10	2.33±0.09	<i>Aspergillus</i>	*	0.1078	*	*	0.1078	*
M11	-	-	*	*	*	*	*	*
E1	1.66±0.05	<i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i>	*	*	*	*	*	*
E2	0.66±0.02	<i>Cladosporium</i>	*	*	*	*	*	*
E3	-	-	*	*	*	*	*	*
S1	2.66±0.06	<i>Penicillium</i>	*	0.2790	*	*	0.2790	*
S2	2.66±0.02	<i>Cladosporium</i>	*	*	*	*	*	*
S3	0.33±0.02	<i>Cladosporium</i> <i>Polysctanum</i>	*	*	*	*	*	*
Ş1	2.33±0.04	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i>	*	*	*	*	*	< 5
Ş2	1.66±0.03	<i>Cladosporium</i>	*	*	*	*	*	*
Ş3	1±0.01	<i>Polysctanum</i>	*	*	*	*	*	*

\* Tespit edilmedi (M1-M10:Merkez 1.bölge-10.bölge, E1-E3 Emirdağ 1.bölge-Emirdağ 3.bölge, S1-S3 Sultandağı 1.bölge-Sultandağı 3.bölge, Ş1-Ş3:Şuhut 1. bölge- Şuhut 3. bölge)

\* Not detected (M1-M10: Center 1st region-10th region, E1-E3 Emirdağ 1st region-Emirdağ 3rd region, S1-S3 Sultandağı 1st region-Sultandağı 3rd region, Ş1-Ş3: Şuhut 1st region- Şuhut 3rd region)

## TARTIŞMA

Mikotoksinler, tarım ürünlerinde ekonomik sorunların yanı sıra sağlık açısından da önemli riskler oluşturmaktadır. Mikotoksinler kurutulmuş meyve ve sebze ürünlerinin yetiştirilmesi, toplanması, taşınması, kurutulması ve depolanması aşamalarından herhangi birinde oluşabilmektedir. Kuruyemişler aflatoksin ve okratoksin açısından en riskli ürünler arasında yer aldığından dolayı bu konuyla ilgili çalışmalar günümüzde de önemini korumaktadır.

Türkiye'de kuruyemişlerde yapılan farklı çalışmalarda elde edilen aflatoksin ve okratoksin miktarları genel olarak Türk Gıda Kodeksi'nin izin verdiği sınırlar dahilindedir (Gürses, 2006; Başaran ve Özcan, 2007; Özay vd., 2008; Şen ve Nas, 2010; Turan ve İslam 2016; Karaosmanoğlu 2023). Yaptığımız çalışma ile de Afyonkarahisar'da satışa sunulan fındıklardaki aflatoksin ve okratoksin miktarlarının Türk Gıda Kodeksi Limitleri arasında olduğu tespit edilmiş ve çalışmamız sonuçlar açısından diğer çalışmalarla paralellik göstermiştir. Mikotoksin miktarı TGK limitleri içerisinde olsa da bu bileşenlerin zamanla vücutta birikme ihtimali de göz ardı edilmemelidir. Dolayısıyla gıdalardaki mikotoksin miktarı TGK'nin izin verdiği sınırlar dahilinde olsa bile uzun vadede sağlık riski bulundurduğu unutulmamalıdır.

Bu çalışmada Afyonkarahisar il merkezi ve ilçelerinde bulunan 20 farklı lokal marketten alınan fındık örneklerinden fungal izolasyon ve aflatoksin analizleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda 2 lokalite dışında 18 farklı marketten alınan fındık örneklerinde fungus kontaminasyonu tespit edilmiştir. Fındık örneklerinden elde edilen fungus kolonileri cins düzeyinde tanımlanmış olup tüm lokasyonlardan elde edilen fungal genuslar benzerlik göstermiştir. Lokaliteler arasında küçük farklılıklar olmasına rağmen tüm bölgelerden izole edilen funguslar; *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* ve *Polystanum* gibi bazı temel fungus cinsleri ile temsil edilmektedir. Fungal kontaminasyon değerlendirildiğinde *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Cladosporium* en sık görülen funguslardır. Benzer şekilde Debes tarafından 2010 yılında Suudi

Arabistan'da çeşitli kuruyemiş örnekleri üzerinde yapılan bir çalışmada da baskın fungus türleri olarak *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus spp.* ve *Penicillium spp.* belirlenmiş olup çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Yine Gürses (2006) Erzurum'da yaptığı çalışmada çeşitli fındık örneklerinde *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerini yüksek oranda tespit etmiştir. Bunun yanı sıra Özay ve arkadaşları (2008) Türkiye'deki fındık örneklerini üç yıl boyunca incelemişler ve mikolojik çalışma sonucunda *Aspergillus parasiticus* (%11) ve *Aspergillus flavus* (%89) dahil olmak üzere toplam 5546 adet fungus izole etmişlerdir. Bu çalışmada da *Aspergillus* cinsi baskın fungal kirleticiler arasında yer almıştır. Yine Saffari ve ark. (2021) İsfahan'daki süpermarketlerden rastgele topladıkları 100 fındık örneğini fungal kontaminasyon ve aflatoksin bulaşı açısından değerlendirmişler ve örneklerin %78'inde *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Ulocladium*, *Alternaria*, *Drechselera*, *Trichothecium*, *Scopulariopsis* ve *Mucor* olmak üzere dokuz farklı cinsteki fungus tespit etmişlerdir. *Aspergillus flavus* ile kontamine olmuş örnekler aflatoksin varlığını belirlemek için incelendiğinde %72'sinin AFB1, AFB2 ve AFG2 ile kontamine olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda pek çok lokalitede *Aspergillus* kontaminasyonu olduğu tespit edilmiş olup tüm bu çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Aflatoksin ve okratoksin üretimini etkilediği düşünülen birçok farklı çevresel faktörler bilinmektedir ancak bunlar arasında sıcaklık ve nem oldukça kritik öneme sahiptir. Bu çalışmada da satışa kadarki geçen sürede alınan fındık numunelerinin sıcaklık, nem ve saklama koşulları birbirinden farklı olduğundan dolayı hem fungus kontaminasyon miktarları hem de funguslar cins bazında bazı farklılıklar göstermiştir. Aflatoksin ve okratoksin analizlerinden elde edilen veriler incelendiğinde birçok fındık örneğinde aflatoksin miktarı tespit sınırının altında olduğundan tespit edilememiştir. Akçin ve Bostan (2019) Giresun ilinde yetiştirilen Tombul fındık çeşidi ile yaptıkları çalışmada, damla sulama yöntemiyle farklı sulama programlarına göre sulanan fındığın depolama süresince su aktivitesi değişimi araştırılmışlar aynı zamanda aflatoksin içeriği de belirlemişler ve bütün örnek gruplarında herhangi

bir aflatoksin oluşumu tespit etmemişlerdir. Karaosmanoğlu (2022) yaptığı çalışmada Tombul fıncığının bazı fiziksel, kalite ve renk özellikleri ile aflatoksin düzeyine geç hasat zamanının etkisini belirlemiştir. Çalışma sonuçlarında geç hasadın fıncıkların biyometrik ve renk özelliklerine olumsuz bir etkisinin olmadığını ve hiçbir dönemde fıncık örneklerinde aflatoksin oluşmadığını tespit etmiş, bu nedenle aflatoksin sorununun hasattan sonraki aşamalardan kaynaklanabileceğini bildirmiştir. Yine Karaosmanoğlu (2023) Tombul ve Karafıncık çeşitleri ile yaptığı bir diğer çalışmada farklı ambalajların depolama süresince geometrik ve renk özelliklerini ve de aflatoksin düzeyi değişikliklerini değerlendirmiş, bir yıllık depolama süresince örneklerdeki aflatoksin oluşumunu takip etmiştir. Depolama süresinin meyve ve iç boyutlarını genellikle etkilemediği ancak sağlam iç oranını düşürdüğü, kusurlu iç oranı ve beyazlama oranını arttırdığı ayrıca renk değerlerini duysal olarak fark edecek düzeyde etkilemediği gözlenmiştir. Ancak depolama süresince hiçbir örnekte aflatoksin oluşumuna rastlanmamıştır. Çalışmamıza benzer şekilde hem ülkemiz hem de farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda aflatoksin ve okratoksin miktarlarının eser miktarda olduğu veya tespit limitinin altında kaldığı görülmüştür (Cheraghali vd., 2007; Fernane vd., 2010; Imperato vd., 2011; Ekici vd., 2011).

Samimi ve ark. (2024) ithal fıncık örneklerindeki AFB1 miktarının belirlenmesi için yürüttükleri çalışmada test ettikleri tüm örneklerde AFB1 tespit etmiştir. Ancak bir örnek hariç tüm örneklerde AFB1 seviyeleri maksimum kabul edilebilir sınırlar arasında bulunmuştur. Araştırmacılar ithal fıncık tüketiminden kaynaklanan AFB1 bulaşının karaciğer kanseri açısından risk oluşturabileceği sonucuna ulaşmışlar ve ülkelerin özellikle küf oluşumuna elverişli iklime sahip ülkelerden ithal edilen kuruyemişlerdeki aflatoksin içeriklerini izlemeleri önermişlerdir. Bu çalışmaya benzer biçimde diğer birçok çalışmada ise aflatoksin ve okratoksin tespit edilmiş ancak bu değerler genel olarak yasal sınırlar içerisinde kalmıştır (Başaran ve Özcan, 2007; Arroyo-Manzanares vd., 2013; Sedefoğlu, 2013; Elzupir, 2018).

Yapılan bu çalışmada fıncık örneklerinde farklı aflatoksin miktarları tespit edilmiş ancak bu verilerin de diğer çalışmalara benzer şekilde yasal limitler arasında olduğu görülmüştür. Taranan tüm numunelerdeki okratoksin miktarı genel olarak tespit sınırları altında kalmış ancak yalnızca iki numunede 5 ng/ml'nin altında olduğu saptanmıştır. En yüksek aflatoksin miktarının merkezi 5. örnek alanda 1.8070 ng/ml AFG1 olduğu belirlenmiştir. Bu oran çalışmamız için en yüksek veri olmasına rağmen AFB1 için Türk Gıda Kodeksi'nin izin verdiği sınır olan 5 ng/g olup, toplam AF için 10 ng/g'ın oldukça altındadır. Ancak aflatoksin kontaminasyonu ile uzun süreli beslenmenin canlılar üzerinde olumsuz etkileri olabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle küf kontaminasyonunun önlenmesi ve gıda kontaminasyonunun detoksifikasyonu oldukça önemlidir.

Bu çalışmada aflatoksin ve okratoksin düzeyleri yasal sınırlar içerisinde belirlenmiş olsa da satışa sunulan fıncıklarda fungal kontaminasyon sebebiyle bekleme süreleri, nem ve sıcaklık gibi değişen koşullar göz önüne alındığında aflatoksin düzeylerinin zamana bağlı olarak artabileceği unutulmamalıdır. Çünkü fungal kontaminasyonunun zamana ve değişen iklim koşullarına bağlı olarak mikotoksin salgısını arttırabileceği bir gerçektir. Zamanla biriken bu aflatoksinlerin yasal limitleri aşabileceği unutulmamalıdır. Ya da sınırların üzerinde olmasa bile beslenmenin bir parçası olan fıncığın tüketimiyle zaman içerisinde vücutta birikebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Özetle aflatoksin ve okratoksinler akut etkileri açısından oldukça toksik olabildikleri gibi daha da önemlisi nefrotoksik, immünotoksik, östrojenik ve teratojenik etkileri nedeniyle ciddi kronik yan etkilere neden olabilirler. Tüm çalışmalar AF'lerin en güçlü kanserojenler arasında sayılması gerektiğini göstermiştir (Borchers vd., 2010; Wu vd., 2014; Samimi vd., 2024). Sonuç olarak gıda maddelerinde bulunan aflatoksinler sağlık açısından tehdit oluşturmaktadır. Bu çalışma Afyonkarahisar bölgesinde satışa sunulan fıncıklara yönelik ilk aflatoksin taraması olma özelliğini taşımaktadır. Bazı örneklerde limitlerin

altında da olsa aflatoksin varlığı gözlemlenmiştir. Bu çalışma, Afyonkarahisar'da yerel pazarlarda satılan fındıklarda AF ve OTA tehlikesi hakkında temel yararlı bilgiler vermekte olup, bu bölge için bu konuda yapılan ilk tarama çalışmasıdır. Her iki mikotoksinin de gıdalardaki görülme oranının yüksek olması, gıdalardaki bu kontaminasyonun değerlendirilmesi ve minimum düzeyde tutulması için bu tür tarama çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

#### TEŞEKKÜR

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından (17.KARİYER.178) desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

Adetunji, M.C., Aliko, O.P., Awa, N.P., Atanda, O.O., Mwanza, M. (2018). Microbiological quality and risk assessment for aflatoxins in groundnuts androasted cashew nuts meant for human consumption. *Journal of Toxicology*, <http://dx.doi.org/10.1155/2018/1308748>.

Afolabi, C.G., Ezekiel, C.N., Ogunbiyi, A.E., Oluwadairo, O.J., Sulyok, M. (2020). Fungi and mycotoxins in cowpea (*Vigna unguiculata* L) on Nigerian markets. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 13(1):52-58.

Akçin, Y., Bostan, S.Z. (2019). Farklı Sulama Programlarının 'Tombul' Fındık Çeşidinde Depolama Süresince Su Aktivitesine Etkisi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5(2):308- 313.

Anonymous (2021). Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. <https://www.fao.org/3/x2100t/x2100t08.htm> (Erişim Tarihi: 05.11.2021)

Arroyo-Manzanares, N., Huertas-Pérez, J., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M. (2013). A new approach in sample treatment combined with UHPLC-MS/MS for the determination of multiclass mycotoxins in edible nuts and seeds. *Talanta*, 115:61-67.

Asghar, M.A., Ahmed, A., Iqbal, J. (2016). Aflatoxins and ochratoxin A in export quality raisins collected from different areas of Pakistan. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 9(1):51-58. <http://dx.doi.org/10.1080/19393210.2015.1127293>.

Baquião, A.C., Lopes, E.L., Corrêa, B. (2016). Molecular and mycotoxigenic biodiversity of *Aspergillus flavus* isolated from Brazil nuts. *Food Research International*, 89:266-271.

Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi, 4th Ed. USA. Prentice-Hall, Inc. [https://www.academia.edu/35499449/illustrated\\_genera\\_of\\_imperfect\\_fungi\\_fourth\\_edition](https://www.academia.edu/35499449/illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fourth_edition). Barnett\_y\_Hunter.\_pdf.pdf, 19.03.2020.

Basaran, P., Özcan, M. (2008). Occurrence of aflatoxins in various nuts commercialized in Turkey. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1745-4565.2008.00143>.

Belli, N., Ramos, A.J., Coronas, I., Sanchis, V., Marin, S. (2005). *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *Journal of Applied Microbiology*, 98:839-844.

Blomhoff, R., Carlsen, M.H., Andersen, L.F., Jacobs, D.R. (2006). Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*, 96(2):52-60. <http://dx.doi.org/10.1017/BJN20061864>.

Borchers, A., Teuber, S.S., Keen, C.L., Gershwin, M.E. (2010). Food safety. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 9:95-141.

Butler, E.E., Mann, M.P. (1959). Use of cellophane tape for mounting and photographing phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, 49:231-232.

Cary, J.W., Ehrlich, K.C. (2006). Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia*, 162:167-177.

Cheraghali, A.M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Aliabad, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L.,



- Soleimany, E., Zamanian, F. (2007). Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*, 45:812-816.
- Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcero, A.M. (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology*, 111:5-9.
- Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs consolidated version 01 Sept (2012). European Community, Brussels. <http://eur-ex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20120901:EN:PDF>. Accessed 31 December 2012.
- Commission Regulation. 2012. (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs consolidated version 01 Sept (2012). European Community, Brussels. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20120901:EN:PDF>. Accessed 31 December 2012.
- Cunha, S.C., Sá, S.V.M., Fernandes, J.O. (2018). Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 114:260-269.
- Deabes, M. (2010). Fungi and aflatoxins contamination in nuts imported to Saudi Arabia. National Research Center, Saudi Arabia. P310-008 *Abstracts/Toxicol Letter*, 196S, S37-S351 doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.1096.
- Ekinci, R., Otag, M., Kadakal, C. (2014). Patulin & ergosterol: New quality parameters together with aflatoxins in hazelnuts. *Food Chemistry*, 150:17-21.
- Elzupir, A.O., Alamer, A.S. (2015). Quantitative cancer risk of aflatoxin in peanutbutter and vegetable oils: Sudan case study. *Toxin Reviews*, 33:202-205.
- Elzupir, A.O. (2018). Seasonal variation and health implications due to aflatoxins in nuts sold in Riyadh region. *Revue Francaise d'Allergologie*, 59(1):15-21.
- Emilio, R. (2010). Health benefits of nut consumption. *Nutrients*, 2:652-682.
- Fernane, F., Cano-Sancho, G., Sanchis, V., Marín, S., Ramos, A.J. (2010). Aflatoxins and ochratoxin A in pistachios sampled in Spain: occurrence and presence of mycotoxigenic fungi. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 3(3):185-192.
- Ghali, R., Hmaissia-Khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedili, A. (2009). HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. *Food Control*, 20:716-720.
- Gonzalez, L., Juan, C., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J. (2006). Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and nonorganic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology*, 107:223-227.
- Grajewski, J., Blajet-Kosicka, A., Twaruzek, M., Kosicki, R. (2012). Occurrence of mycotoxins in polish animal feed in years 2006–2009. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96:870-877.
- Gürses, M. (2006). Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almonds and roasted chickpeas (leblebi) sold in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 9:395-399.
- Hammami, W., Fiori, S., Al Thani, R., Ali Kali, N., Balmes, V., Migheli, Q., Jaoua, S. (2014). Fungal and aflatoxin contamination of marketed spices. *Food Control*, 37:177-181.
- Hepsag, F., Golge, O., Kabak, B. (2014). Quantitation of aflatoxins in pistachios and groundnuts using HPLC-FLD method. *Food Control*, 38:75-81.
- Hepsag, F., Hayoğlu, İ. (2022). Çukurova ve Doğu Akdeniz Bölgesi'nde satışa sunulan kırmızı pul biber ve kuru incirler'de aflatoxin B1 ve toplam aflatoxin (B1,B2,G1,G2) içeriğinin yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi ile belirlenmesi. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(3): 1393-1406.
- Hontanaya, C., Meca, G., Luciano, F.B., Manes, J., Font, G. (2015). Inhibition of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 production by *Aspergillus parasiticus* in nuts using yellow and oriental mustard flours. *Food Control*, 47:154-160.

- Imperato, R., Campone, L., Piccinelli, A.L., Veneziano, A., Rastrelli, L. (2011). Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. *Food Control*, 22:1905-1910.
- International Agency for Research on Cancer, IARC. 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 56:257-263.
- İnanç, A.L. (2024). Dökme ve ambalajlı baharatlık kırmızı biberlerin aflatoksin kontaminasyonunun belirlenmesi, *Kabramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 27(3):695-703.
- Kafouris, D., Christofidou, M., Christodoulou, M., Christou, E., Ioannou-Kakouri, E. (2017). A validated UPLC-MS/MS multi-mycotoxin method for nuts and cereals: results of the official control in Cyprus within the EU requirements. *Food and Agricultural Immunology*, 28:90-108.
- Karaosmanoğlu, H. (2022). The effect of late harvest on the biometric and color characteristics and aflatoxin level of Tombul hazelnuts. *Harran Journal of Agricultural and Food Science*, 26(4):549-559.
- Karaosmanoğlu, H. (2023). Farklı Ambalaj Materyallerinin Depolanan Fındıkların Geometrik ve Renk Özellikleriyle Aflatoksin Oluşumuna Etkisi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 38(2):331-352.
- Moss, M.O. (1998). Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology*, 84:62-76.
- Nguyen, K.T.N., Ryu, D. (2014). Concentration of ochratoxin A in breakfast cereals and snacks consumed in the United States. *Food Control*, 40:140-144.
- Özay, G., Seyhan, F., Pembeci, C., Saklar, S., Yılmaz, A. (2008). Factors influencing fungal and aflatoxin levels in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) during growth, harvest, drying and storage: A 3-year study. *Food Additives and Contaminants*, 25(2):209-218.
- Pittet, A. (1998). Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds e an updated review. *Revue de Medecine Veterinaire*, 149:479-492.
- Prelle, A., Spadaro, D., Garibaldi, A., Gullino, M. (2012). Aflatoxin monitoring in Italian hazelnut products by LCeMS. *Food Additives and Contaminants Part B*, 5:279-285.
- Saffari, E., Madani, M., Karbasizade, V., Shakib, P. (2021). Detection of Fungal and Bacterial Contamination of Hazelnut and Determination of Aflatoxin B by HPLC Method in Isfahan, Iran. *Current Medical Mycology*, 7(4):1-5.
- Samimi, P., Aslani, R., Molae-Aghae, E., Sadighara, P., Shariatifar, N., Khaniki, G.J., Ozcakmak, S., Reshadat, Z. (2024). Determination and Risk Assessment of Aflatoxin B1 in the Kernel of Imported Raw Hazelnuts from Eastern Azerbaijan Province of Iran. *Scientific Reports*, 14:6864.
- Sedefoğlu, C. (2013). Antep fıstıklarında okratoksin A ve aflatoksin varlığının incelenmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Stroka, J., Ankle, E., Jorissen, U., Gilbert, J. (2000). Immunoaffinity column clean up with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. *The Journal of AOAC International*, 83:320-340.
- Şen, L., Nas, S. (2010). Fındık ve antep fıstığının mikotoksin problemi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1):49-56.
- Tolosa, J., Font, G., Mañes, J., Ferrer, E. (2013). Nuts and dried fruits: Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins. *Food Control*, 33:215-220.
- Toptaş, Ö., Erköse, Genç, G. (2023). Yaygın mikotoksinler: aflatoksinler, okratoksin A, fumonisinler, deoksinivalenol ve zearalenon. *Journal of Ankara Health Sciences*, 12(1): 87-98.
- Turan, A., İslam, A. (2016). Çakıldak Fındık Çeşidinde Kurutma Ortamları ve Muhafaza Süresine Bağlı Olarak Meydana Gelen Değişimler. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(2):272-285.
- Varga, E., Glauner, T., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M. (2013).

Development and validation of a (semi-)quantitative UHPLC-MS/MS method for the determination of 191 mycotoxins and other fungal metabolites in almonds, hazelnuts, peanuts and pistachios. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research*, 405:5087–5104 DOI 10.1007/s00216-013-6831-3.

Wu, F., Groopman, J.D., Pestka, J.J. (2014). Public health impacts of foodborne mycotoxins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 351-372.

Var, I., Tekin, A. (2023). Piyasada tüketime sunulan ayçiçek ve mısırözü yağlarında aflatoksin varlığının araştırılması. *Gıda*, 48(6):1304-1317.

Yang, J. (2009). Brazil nuts and associated health benefits: a review. *LWT - Food Science and Technology*, 42:1573-1580.

Yu-jiao, W., Ji-yun, N., Zhen, Y., Zhi-xia, L., Yang, C., Farooq, S. (2018). Multi-mycotoxin exposure and risk assessments for Chinese consumption of nuts and dried fruits. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(7):1676-1690.



## DEVELOPING MENU PLANNING SOFTWARE USING OPTIMIZATION AND ARTIFICIAL INTELLIGENCE ALGORITHM

**Shahmirzali HUSEYNOV<sup>a</sup>, Fatih TARLAK<sup>b\*</sup>**

<sup>a</sup>Department of Artificial Intelligence Engineering, Kartal, Istanbul, Türkiye

<sup>b</sup>Department of Bioengineering, Gebze Technical University, Gebze, Kocaeli, Türkiye

Received /Geliş: 12.06.2024; Accepted/Kabul: \*\*.\*\*.2024; Published online/Online baskı: 21.09.2024

Huseynov, S., Tarlak, F. (2024). Developing menu planning software using optimization and artificial intelligence algorithm. GIDA (2024) 49 (5) 833-846 doi: 10.15237/ gida.GD24063

Huseynov, S., Tarlak, F. (2024). Optimizasyon ve yapay zekâ algoritmaları kullanarak menü planlama yazılımı geliştirilmesi. GIDA (2024) 49 (5) 833-846 doi: 10.15237/ gida.GD24063

### ABSTRACT

In today's world, awareness of health and nutrition is growing, emphasizing the need for personalized nutrition recommendations and reducing food waste. This study collected demographic data and food preferences from users and analyzed them using artificial intelligence models. A model developed with the Random Forest algorithm was trained to predict users' future preferences and guide menu planning. Tests showed that combining AI with optimization techniques successfully creates user-focused menus, enhancing satisfaction and reducing food waste. The study also highlighted challenges related to the dataset's size, pointing to a need for more qualitative data. The developed model provides innovative solutions for catering companies and institutions offering mass dining, improving employee satisfaction while minimizing waste. Future research aims to refine the model for broader applications.

**Keywords:** Artificial intelligence, optimization algorithms, linear programming, personalized menu, catering

## OPTİMİZASYON VE YAPAY ZEKÂ ALGORİTMALARI KULLANARAK MENÜ PLANLAMA YAZILIMI GELİŞTİRİLMESİ

### ÖZ

Günümüzde sağlık ve beslenme bilinci giderek artmakta, bu da kişiye özel beslenme önerilerinin ve gıda israfının azaltılmasının önemini vurgulamaktadır. Bu çalışmada, kullanıcılardan demografik veriler ve gıda tercihleri toplanarak yapay zeka modelleri ile analiz edilmiştir. Random Forest algoritması kullanılarak geliştirilen bir model, kullanıcıların gelecekteki tercihlerini tahmin etmek ve menü planlamasına rehberlik etmek üzere eğitilmiştir. Yapılan testler, yapay zeka ve optimizasyon tekniklerinin birleştirilmesinin kullanıcı odaklı menüler oluşturduğunu, memnuniyeti artırdığını ve gıda israfını azalttığını göstermiştir. Çalışma ayrıca, veri setinin boyutuyla ilgili zorluklara dikkat çekerek, daha nitelikli verilere olan ihtiyacı ortaya koymuştur. Geliştirilen model, toplu yemek hizmeti sunan catering şirketleri ve diğer kurumlar için yenilikçi çözümler sunarak çalışan memnuniyetini artırırken israfı da minimize etmektedir. Gelecek araştırmalar, modelin daha geniş uygulamalar için geliştirilmesini hedeflemektedir.

**Anahtar kelimeler:** Yapay zekâ, optimizasyon algoritmaları, doğrusal programlama, kişiselleştirilmiş menü, catering

\* Corresponding author/ Sorumlu yazar

✉: ftarlak@gtu.edu.tr

☎: (+90) 262 605 20 76

Shahmirzali Huseynov; ORCID no: 0009-0000-2525-3029

Fatih Tarlak; ORCID no: 0000-0001-5351-1865

## INTRODUCTION

In today's health-conscious era, personalized nutrition is becoming crucial. This research aims to use artificial intelligence (AI) and optimization algorithms to develop tailored menu plans based on personal health and dietary preferences. General nutrition guidelines often fall short of meeting individual needs; this project targets creating scientifically grounded, customized diet plans that align with each person's unique requirements. Technological advancements are pivotal in enhancing life quality by providing personalized health and nutrition solutions. AI and optimization algorithms are particularly effective in formulating diet plans that cater to specific health statuses and dietary choices. This integration of technology not only caters to personal preferences but also enhances nutritional effectiveness and employee satisfaction in organizational settings, particularly in catering services that often overlook individual dietary needs, leading to increased food waste and reduced satisfaction (Hou et al., 2022). The goal of this research is to optimize how catering companies address the nutritional demands of their clientele, minimizing waste and enhancing meal satisfaction. When dietary preferences are ignored, not only does food waste escalate, but it also leads to financial and environmental drawbacks. By applying AI and optimization techniques, the developed model efficiently generates meal plans that reduce waste and are attuned to the diverse preferences of employees. This model is not only a solution for catering companies but is also applicable to broader mass nutrition services, promoting more sustainable and efficient food service operations. In summary, this study illustrates the feasibility of creating personalized menu plans with AI and optimization, aiming to boost employee satisfaction and minimize food waste. The model has demonstrated effectiveness and promises broader application in future enhancements across various sectors.

Artificial intelligence and machine learning are increasingly integrated into the food industry, revolutionizing various aspects of food processing, manufacturing, logistics, and supply

chain management. Known as Industry 4.0 or the Smart Factory, this modern era utilizes AI to improve efficiency, minimize waste, and ensure food safety. With food safety regulations being a primary concern, transparency in the food supply chain is crucial. AI supports monitoring the entire supply chain process, aiding in price prediction, production process optimization, inventory management, and logistics management. AI can even determine the origin of a specific crop. Tools like Symphony Retail-AI help predict demand for transportation, pricing, and inventory, preventing overstock and waste (Hebbar, 2020). Previously, manufacturers needed numerous employees for repetitive tasks such as food sorting. AI-based applications can now easily identify which potatoes are best for chips and which are ideal for French fries, making the sorting process faster, more efficient, and accurate (Misra et al., 2022). Producing various items involves complex systems. Machine learning plays a vital role in the predictive maintenance of these large machines, reducing operational costs and labor, optimizing resource use, and increasing output. It employs machine learning techniques, cameras, sensors, and internet connectivity (Sharma et al., 2021). Machine learning is also crucial in food delivery, facilitating smart logistics and tracking crops and vegetables. It reduces vegetable waste and enhances restaurant meal delivery (Li et al., 2019). Modern industrial and logistical systems benefit from expansive and powerful computing networks. Sensors, machines, systems, intelligent devices, and people within these networks generate constant data. With increased computing power, this Big Data is processed more quickly and in greater detail than ever before. These advancements have ushered in Industry 4.0 or the Smart Factory, highlighting the significance of artificial intelligence technology (Ahmed and Kim, 2017).

## THEORETICAL BACKGROUND

### Optimization and linear programming

Optimization is a mathematical process used to adjust given parameters to best achieve an objective or goal function under specific constraints. The primary aim of optimization is to find the most suitable solution for a given

problem, and it is applied in various fields such as engineering, finance, logistics, and AI (Precup et al., 2020). This process is typically used in situations where costs, time, or distance need to be minimized, or where revenue, efficiency, or performance need to be maximized (Gong, 2022).

Linear Programming (LP) is one of the most common forms of optimization problems. LP determines decision variables under linear constraints to optimize an objective function. The LP gained significant momentum with the development of the simplex method by George Dantzig in 1947 (Chandru and Rao, 1998). The simplex method provides time-efficient solutions to LP problems and has been widely applied, from military logistics to commercial applications (Dantzig, 1982).

The applications of LP are quite diverse. It is widely used in industrial and scientific research for cost-benefit analyses, optimizing agricultural yields, planning routes in commercial aviation, and many other areas (Kulhari, 2023). The flexibility of LP stems from its ability to represent various constraints and objectives through linear equations and inequalities. Additionally, LP problems can be solved using various algorithms, such as the simplex method, primal-dual method, and interior-point method (Tiwari and Agrawal, 2022).

However, many real-world problems are not limited to continuous variables. Some problems require decision variables to take integer values, especially when the nature of the decisions is discrete. In such cases, a more complex method known as Mixed Integer Linear Programming (MILP) comes into play.

### **Optimization and linear programming**

MILP is a more complex form of LP that involves both continuous and integer variables to solve optimization problems. MILP aims to maximize or minimize an objective function under linear constraints (Miltenberger, 2023). This approach is suitable for modeling scenarios where both discrete (integer) and continuous decision variables coexist. For example, in a logistics

problem, optimizing both the number of vehicles (integer) and the quantity of goods to be transported (continuous) simultaneously.

MILP shares similarities with LP as both seek to optimize an objective function under specific linear constraints. However, the key difference lies in the inclusion of integer constraints in MILP models, significantly altering the solution strategies. While LP models deal solely with continuous variables, MILP models incorporate integer variables, allowing for more realistic decision-making scenarios.

MILP problems typically fall into the NP-hard category, meaning they are considerably more challenging to solve compared to LP problems. Common methods for solving MILP problems include Branch-and-Bound, Branch-and-Cut, and Cutting Plane techniques. These methods are designed to systematically explore the solution space and effectively narrow down potential solution candidates.

### **Branch-and-cut method**

The Branch-and-Cut method is a widely used and highly effective technique for solving MILP problems. This method combines two fundamental approaches: Branch-and-Bound and Cutting Planes.

**Branch-and-Bound:** This approach involves partitioning the solution space into smaller subproblems (branching) and working on each subproblem individually to reach an optimal solution. In each branch, solutions that violate integer constraints are excluded. This method helps manage the complexity by breaking down the problem into more manageable parts and solving each part separately.

**Cutting Planes:** This technique adds cutting planes to the solution space to exclude fractional solutions and narrow the feasible region. Cutting planes are mathematical constraints that eliminate portions of the solution space that do not contain integer solutions. Common methods include Gomory cuts and capacitated cuts.

The Branch-and-Cut method is particularly effective for solving MILP problems. Initially, a linear relaxation of the problem is solved, ignoring the integer constraints. The solution obtained usually contains fractional values. At this point, cutting planes are added to narrow the solution space and enforce integer solutions (Balcan et al., 2022). If the linear relaxation solution does not contain integer values, the solution space is partitioned (branching) into subproblems, and each subproblem is solved individually. This process is repeated until the optimal solution is found, adding new cutting planes at each iteration to enforce integer constraints (Basu et al., 2023).

MILP and the Branch-and-Cut method find extensive applications in logistics, production planning, supply chain management, and many other fields. These methods provide effective solutions for complex and large-scale optimization problems, offering significant advantages in decision-making processes.

### **Artificial intelligence and random forest algorithm**

AI is a multidisciplinary field of computer science aimed at creating intelligent machines capable of performing tasks that typically require human intelligence. These tasks include reasoning, learning, problem-solving, perception, and language understanding. AI integrates concepts and methodologies from various domains such as mathematics, statistics, computer science, neuroscience, and cognitive science (Russell and Norvig, 2003). One of the key subfields of AI that focuses on how these intelligent capabilities are acquired and utilized is Machine Learning.

Machine Learning (ML) is a subset of AI that focuses on the development of algorithms that enable computers to learn from and make decisions based on data. Unlike traditional programming, where specific instructions are coded, ML algorithms build models based on sample data, known as training data, to make predictions or decisions without being explicitly programmed for the task (Nasteski, 2017). One of the most common approaches within machine

learning is Supervised Learning, where algorithms are trained on labeled datasets.

Supervised learning is a type of machine learning where the algorithm is trained on labeled data. This means that each training example is paired with an output label. The goal of the algorithm is to learn a mapping from inputs to outputs so that it can predict the output for new, unseen data accurately.

Supervised learning tasks can be divided into two main categories: classification and regression. In classification, the goal is to predict discrete labels, such as determining whether an email is spam or not. In regression, the goal is to predict continuous values, such as forecasting house prices based on historical data.

Common algorithms used in supervised learning include decision trees, support vector machines (SVM), k-nearest neighbour (KNN), Naive Bayes, artificial neural networks, and random forest algorithms.

In this study, classification algorithms were utilized to predict user preferences and create personalized menu recommendations. Classification algorithms are particularly effective when the data needs to be divided into distinct categories. The data used in this study includes user preferences and eating habits, serving as a labeled dataset for the model to predict future preferences. Among the classification algorithms tested, the Random Forest algorithm was chosen for its robustness and performance.

The Random Forest algorithm is an ensemble learning method used for classification and regression tasks. Developed by Leo Breiman and Adele Cutler, it operates by constructing multiple decision trees during training and outputting the mode of the classes (classification) or mean prediction (regression) of the individual trees (Breiman, 2001). The Random Forest algorithm is preferred for its multi-class capabilities and its ability to reduce overfitting. By aggregating the results of multiple decision trees, it provides higher accuracy and compensates for the errors of

individual trees. Additionally, the algorithm helps in determining which features are most influential in making predictions and generally performs well across different datasets and problems.

The Random Forest algorithm works based on two key principles: bagging (bootstrap aggregating) and random feature selection. Bagging involves creating multiple subsets of the original dataset with replacement and training a separate decision tree on each subset. This increases the model's ability to generalize and reduces the risk of overfitting. Random feature selection means that at each split in the decision trees, a random subset of features is chosen, ensuring the trees are diverse and further reducing the risk of overfitting. It performs well on large datasets and high-dimensional spaces, making it applicable in fields such as healthcare, finance, marketing, and bioinformatics.

For the task of accurately predicting users' food preferences and providing personalized menu recommendations, the Random Forest algorithm was found to be particularly effective. It outperformed other tested algorithms in terms of accuracy and overfitting reduction, establishing itself as a reliable and efficient method for classification problems (Liaw and Wiener, 2002).

**MATERIAL AND METHOD**

This study aims to develop software using optimization and AI algorithms that catering companies can use to create personalized menus for their clients. The software provides balanced menu recommendations based on employees' personal data and dietary preferences, aiming to meet their health and nutrition goals while increasing employee satisfaction and reducing food waste. The flow diagram of the method used is shown in Figure 1. This section provides a detailed description of the methods and techniques used.

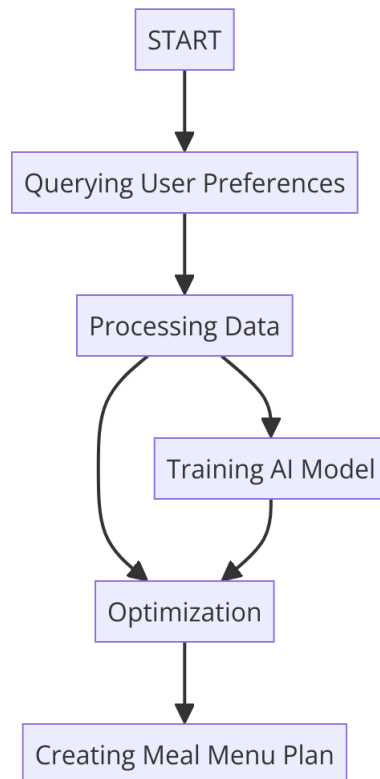


Figure 1. Flow diagram.



### **Tools and technologies used**

This project aimed to develop software that can be utilized by catering companies. The development process involved creating a website that utilizes REST API services to manage optimization and AI functions. These REST APIs were essential for integrating optimization and AI functionalities into the web application. Various libraries and frameworks were employed in the development of this application. The website was designed using modern web development frameworks to ensure a user-friendly interface where users could input their food preferences. This interface then communicated with backend services via REST APIs.

To manage optimization tasks, the PuLP library was used. PuLP is a Python library for linear programming, which played a crucial role in solving the optimization problems involved in menu planning. The Random Forest algorithm was also implemented using the Scikit-learn library to predict user preferences based on their input data. Pandas' library was used for data manipulation and analysis, facilitating the efficient handling of large datasets. The Joblib library was utilized to serialize the trained machine learning models, ensuring that the models could be saved and loaded efficiently without retraining. Overall, the development of this menu planning software for catering companies involved the use of web technologies, REST APIs, and various Python libraries such as PuLP, Pandas, Scikit-learn, and Joblib.

### **Data collection and preprocessing**

The datasets utilized in this project comprised user preferences and nutritional information. User data was collected through surveys that captured demographic details and food preferences. This data was then labeled to effectively train the machine learning models. Additionally, nutritional datasets, which included detailed nutritional information for various food items, were sourced from the Nutrition Information System. These datasets were essential for accurately predicting user preferences and optimizing menu planning to meet dietary requirements and health standards.

The data collection process involved conducting a series of surveys targeted at employees of companies partnered with catering firms. The survey included questions about demographic information such as age, gender, marital status, and activity level, as well as detailed questions regarding food preferences. The survey comprised approximately 20 questions, with food-related questions offering five different response options: "Never," "Rarely," "Moderately," "Often," and "Very Often."

Since this project did not collaborate with a real catering company, the data used was synthetically generated for experimental purposes. This synthetic data generation was performed using Python and various libraries. Specifically, the random library was utilized to adjust the probabilities of survey responses, allowing the creation of datasets under different scenarios. This approach enhanced the project's flexibility and the ability to conduct extensive testing.

Survey results were converted into numerical format for data processing and analysis. This transformation enabled the data to be processed by machine learning algorithms and optimization models. The numerical conversion was carried out using the One-Hot Encoding function, which converted each survey response into corresponding numerical values. Finally, the processed numerical data was stored in a database, making it accessible via API for various analyses.

### **Constraints**

In the optimization model, constraints are based on various nutritional values and user preferences. These constraints are set to meet users' daily needs for calories, protein, carbohydrates, and fats. These general constraints ensure that the model meets the users' requirements for a healthy and balanced diet.

### **Integration**

Developed using Python and the PuLP library, the model employs the CBC\_CMD solver, which utilizes the Branch-and-Cut algorithm to effectively solve complex MILP problems. The

AI model was trained to predict users' meal preferences by analyzing collected data using the Random Forest algorithm. The AI model's predictions were then integrated into the optimization process to generate meal plans.

Table 1. Survey Questions

1	What is your age?
2	What is your gender?
3	What is your activity level?
4	What is your marital status?
5	How often do you prefer meatballs?
6	How often do you include kebab or stew dishes in your meal preferences?
7	How often do you consume fried meat dishes?
8	How often do you prefer chicken dishes?
9	How often do you eat fish dishes?
10	How often do you prefer vegetable dishes?
11	How often do you consume olive oil-based dishes?
12	How often do you eat meat and vegetable dishes?
13	How often do you have soups?
14	How often do you consume rice?
15	How often do you eat pastries?
16	How often do you prefer pasta and noodles?
17	How often do you prefer salads and cold dishes?
18	How often do you consume desserts?
19	What is your daily beverage consumption like?
20	How often do you consume fruit?

Table 2. Constraints

---

1. Four Types of Dishes:

---

- Each menu must include four different types of dishes, categorized into four groups, with one dish from each category.

---

2. Specific Order of Serving:

---

- The dishes in each menu must be served in a specific order.

---

3. Unique Dishes in Each Menu:

---

- Each menu must feature unique dishes, ensuring no repetition of the same dish.

---

4. Limited Use of Similar Color and Texture Dishes:

---

- Dishes with the same color and texture should not appear more than twice in a single menu.

---

5. No Salad with Vegetable Dishes:

---

- Salad should not be served alongside vegetable dishes to ensure nutritional variety.

---

6. No Compote or Stewed Fruits with Soups:

---

- Compote or stewed fruits should not accompany soups.

---

7. No Rice with Stuffed Meat Dishes:

---

- Rice dishes should not be served with stuffed meat dishes.

---

8. No Combination of Rice Pilaf, Yogurt Soup, and Rice Pudding on the Same Day:

---

- Rice pilaf, yogurt soup, and rice pudding should not be included in the same day's menu.

---

9. Nutritional Value Limits:

---

- The nutritional values of menu items must fall within specified limits for carbohydrates, protein, fat, fiber, and energy.

---

10. User Preferences Consideration:

---

- Menus should be optimized based on user preferences collected through demographic and food preference surveys.

---

## FINDINGS AND DISCUSSION

The menu planning software developed in this study has yielded successful results based on various tests and evaluations. The findings are as follows:

**First test:** Responses from 500 users were randomly generated and optimized. The optimization results were positive, with all constraints being met. The comparison of menus optimized with and without AI shows the effectiveness of the AI model in improving the menu planning process.

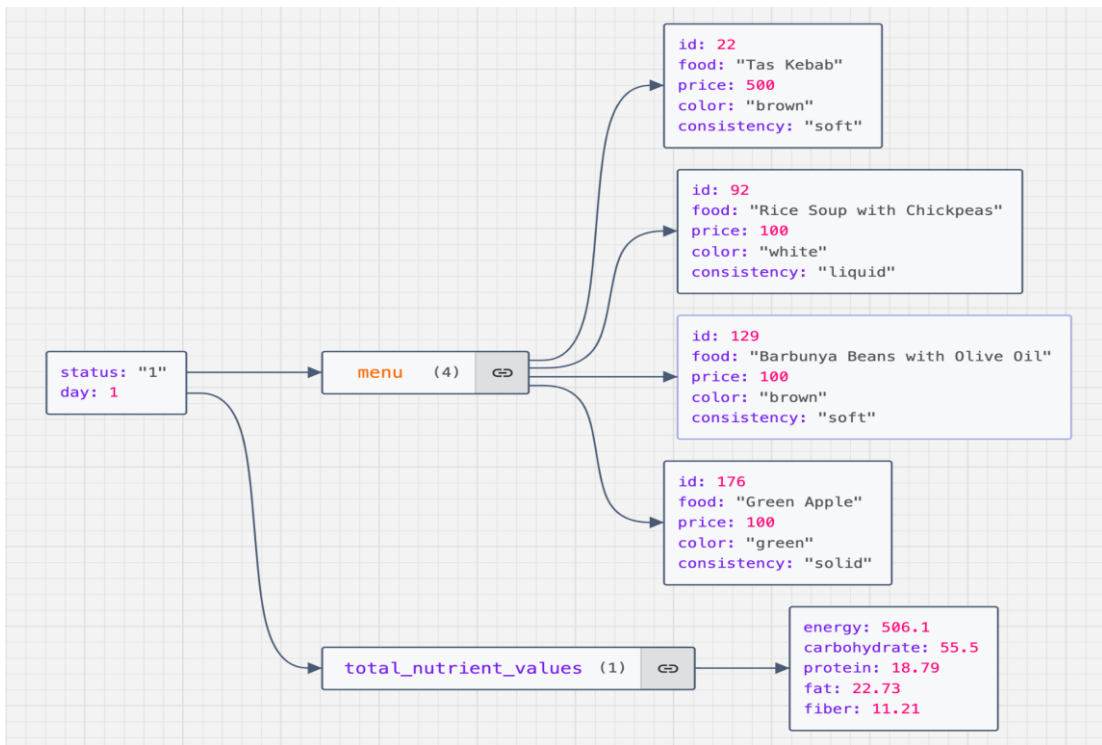


Figure 2. Menu optimized with user preference data without using AI

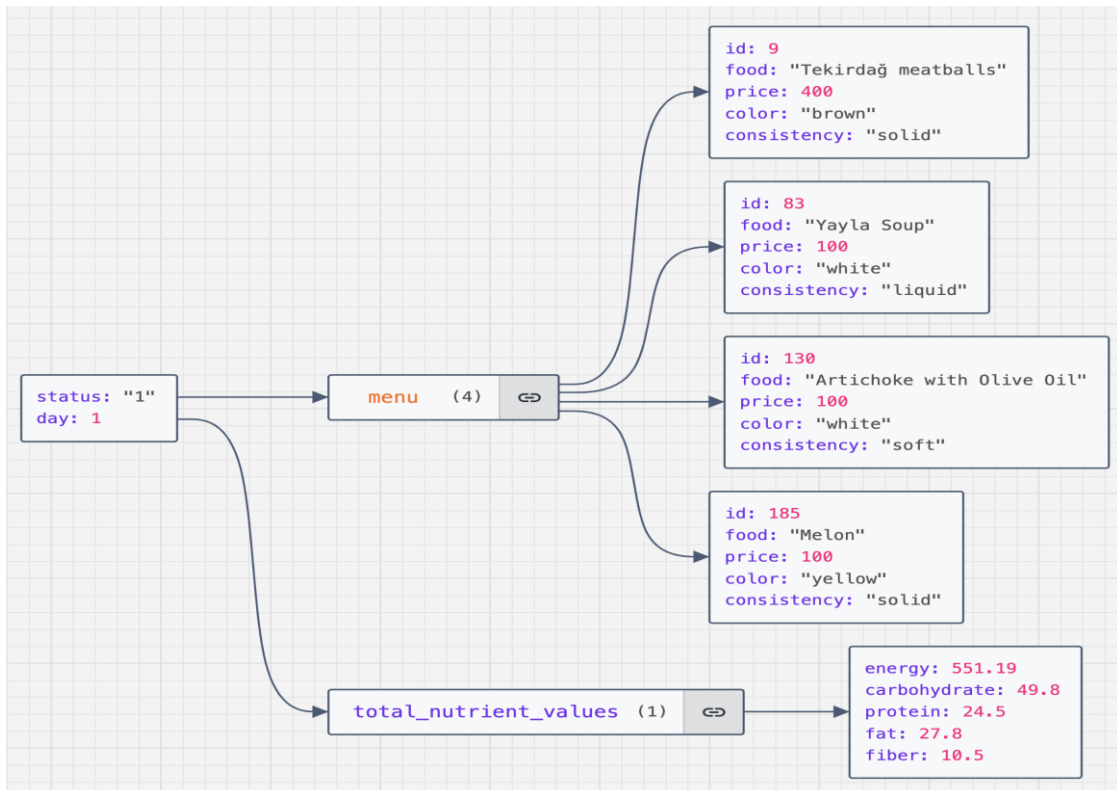


Figure 3. Menu optimized with user preference data using AI

**Second test:** Responses from 5000 users were randomly generated and optimized. Again, all constraints were met, demonstrating the AI model's efficacy. The optimized menus and score

metrics confirm the benefits of incorporating AI in the optimization process.

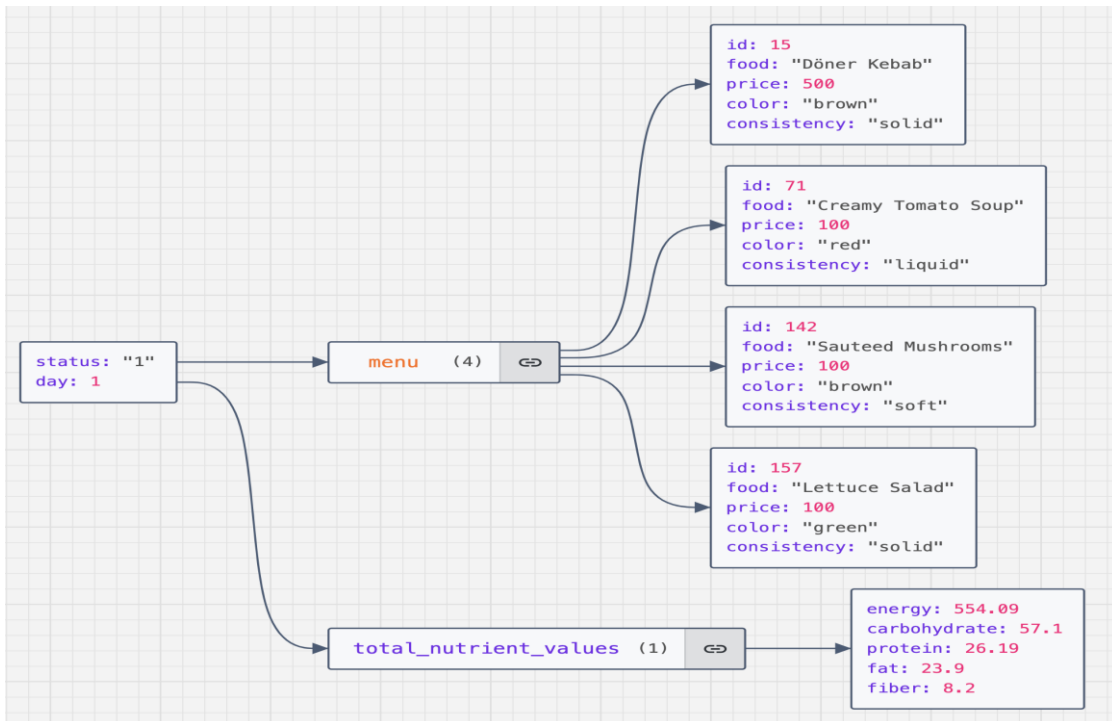


Figure 4. Menu optimized with user preference data without using AI

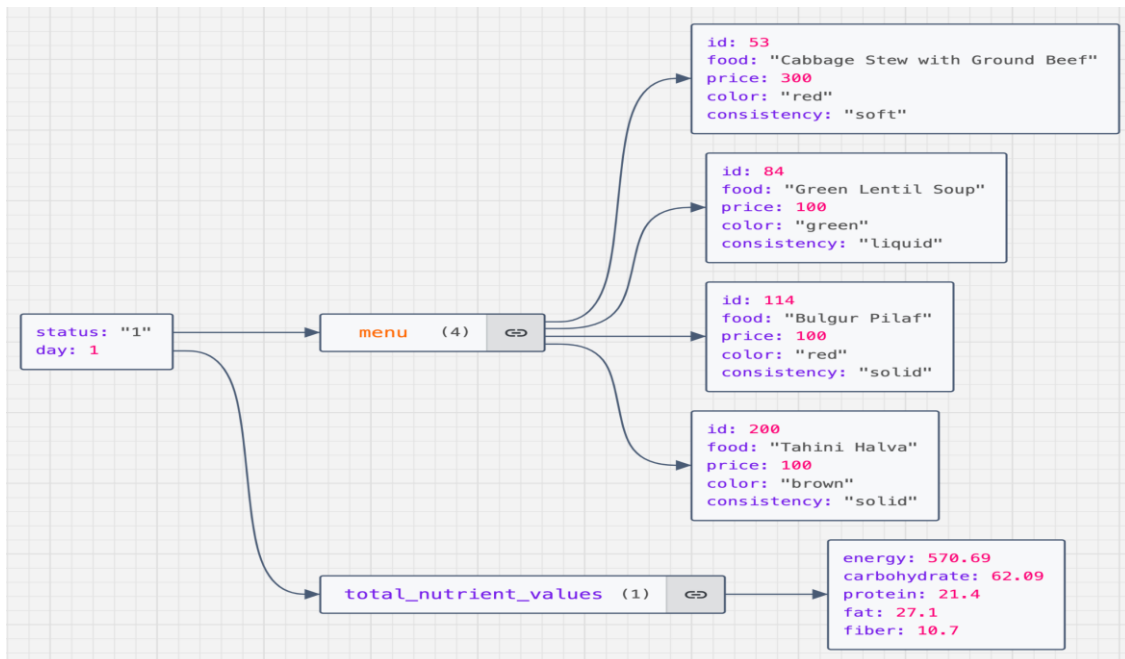


Figure 5. Menu optimized with user preference data using AI

**Third test:** Responses from 15000 users were randomly generated and optimized. The optimization process successfully met all

constraints. This test was conducted to evaluate the impact of dataset size on model performance.

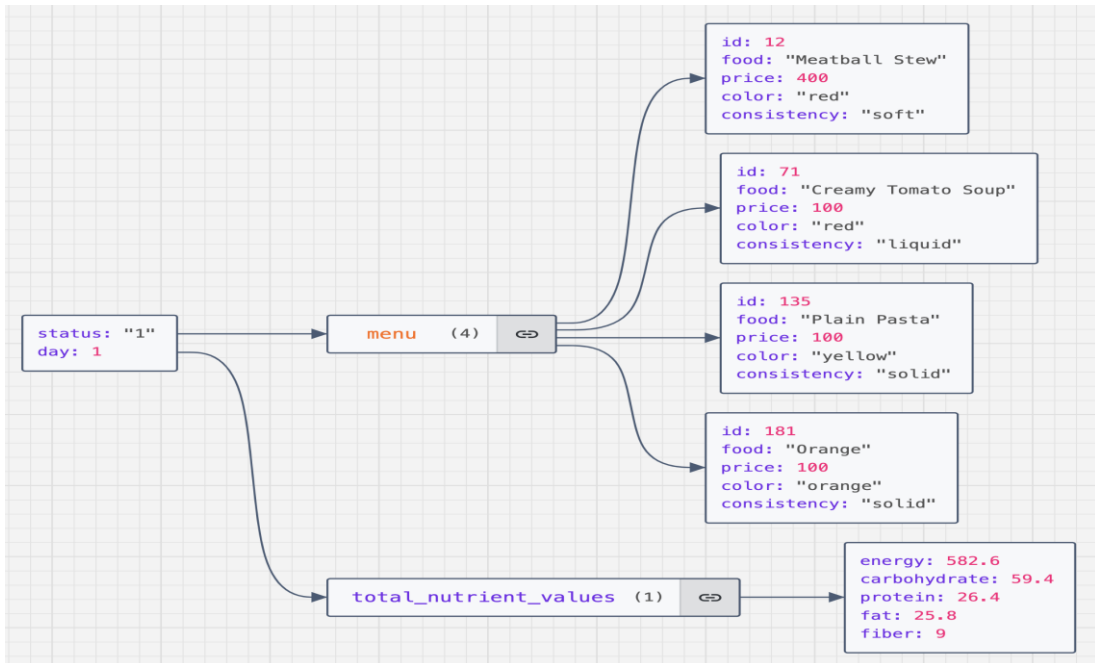


Figure 6. Menu optimized with user preference data without using AI

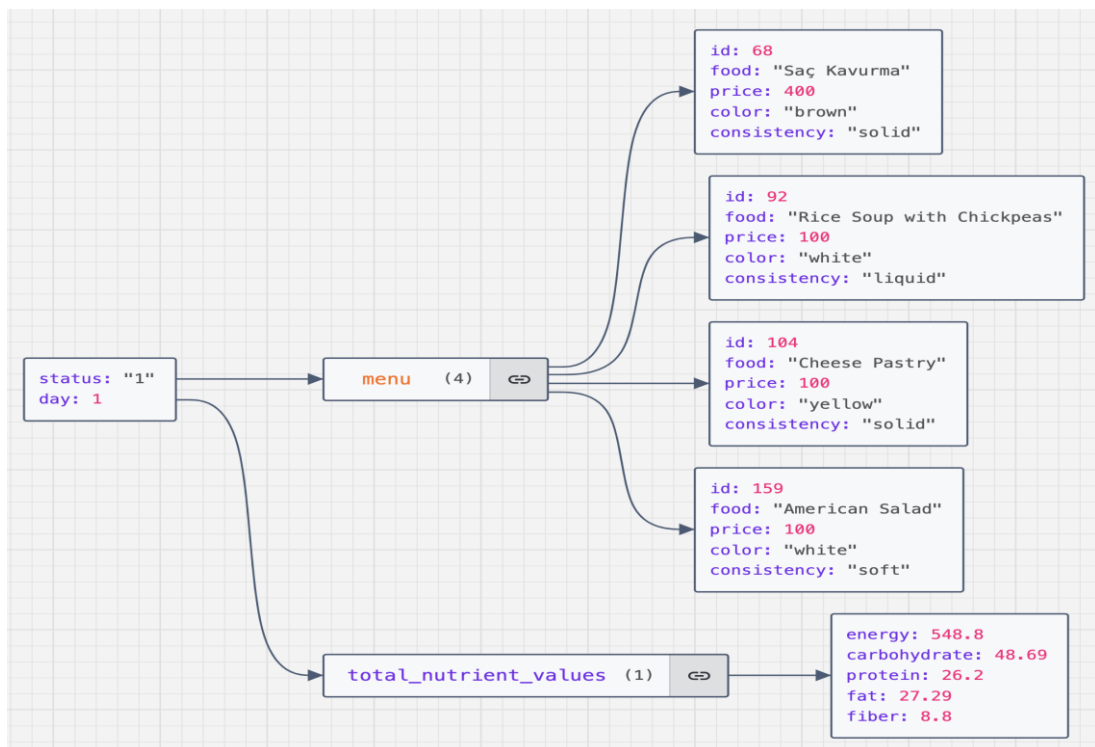


Figure 7. Menu optimized with user preference data using AI

A high Accuracy, Precision, Recall, F1 Score indicates that the model is performing well. Low Precision indicates that the number of false positive predictions is high, while low Recall indicates that the number of false negative predictions is high. Ideally, the aim is to achieve a high F1 Score with high Precision and Recall. Accuracy: Shows the correct rate of all predictions. Precision: Shows how many of the samples predicted as positive are actually positive.

Recall: Shows how many of the true positive samples were predicted as positive. F1 Score: Takes the harmonic average of the Precision and Recall value and provides a balanced performance measure. The test results indicated that increasing the dataset size does not always lead to performance improvement. Instead, as the dataset size increased, a decline in accuracy and other performance metrics was observed:

Table 3. 500 Users Metric Values

Metric	Value
Accuracy	22
F1-Score	21.86
Recall	23
Precision	22

Table 4. 5000 Users Metric Values

Metric	Value
Accuracy	20.27
F1-Score	20.11
Recall	20
Precision	20

Table 5. 15000 Users Metric Values

Metric	Value
Accuracy	19.55
F1-Score	19.54
Recall	19
Precision	19

These findings suggest that more qualitative and representative data are needed to improve model performance. Future work may focus on techniques such as data preprocessing, feature engineering, and model optimization to enhance the AI model's performance.

### CONCLUSION

This study focused on developing software for catering companies by using optimization and artificial intelligence algorithms. The primary aim

was to offer customized menus tailored to users' dietary habits and preferences, thereby achieving optimal solutions for both health and satisfaction. The conducted tests revealed that combining artificial intelligence and optimization techniques enables the creation of user-focused menu plans. However, the performance of the AI models was below expectations, with a significant drop in accuracy as the dataset size increased. This suggests that the model struggled with predictions due to greater diversity and complexity. The

contributions of this work to the literature and practical applications include the effective use of LP and MILP techniques for creating optimal menus by considering nutritional constraints and user preferences. Additionally, integrating AI techniques has provided significant advantages in offering personalized solutions. Nonetheless, the low model performance underscores the need for further data and model improvement efforts. In the context of menu planning, data privacy and user consent are important. User data is securely encrypted and stored, with access limited to authorized personnel only. When necessary, data is anonymized to protect user identities and ensure privacy in case of potential data breaches. Users are informed about what data is collected and how it is used, with full transparency regarding data usage policies, privacy policies, and terms of service. Additionally, users have the right to delete their personal data at any time, enhancing data privacy and user control. Maintaining these high standards is a critical step in earning and sustaining user trust. Future studies should aim to use more qualitative and representative datasets to enhance model performance. Optimizing AI models with advanced techniques and comparing different algorithms will also be beneficial. Moreover, continuously improving the system with user feedback and increasing user satisfaction should be a key focus for future studies. In summary, this study has demonstrated how optimization algorithms and AI techniques can be utilized in personalized menu planning. The findings highlight the potential of these techniques while also emphasizing the need for improved model performance and larger datasets. Future research in this area can significantly contribute to the development of personalized nutrition solutions by exploring and expanding the scope of investigations.

## REFERENCES

- Ahmed, F., Kim, K.Y. (2017). Data-driven weld nugget width prediction with decision tree algorithm. *Procedia Manufacturing*, 10, 1009–1019, <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2017.07.092>
- Balcan, M.-F., Prasad, S., Sandholm, T., Vitercik, E. (2022). Structural analysis of branch-and-cut and the learnability of gomory mixed integer cuts. *Advances in Neural Information Processing Systems*, 35, 33890-33903, <https://doi.org/10.48550/arXiv.2204.07312>
- Basu, A., Conforti, M., Di Summa, M., Jiang, H. (2023). Complexity of branch-and-bound and cutting planes in mixed-integer optimization. *Mathematical Programming*, 198, 787–810, <https://doi.org/10.1007/s10107-022-01789-5>
- Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine Learning*, 45(1), 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
- Chandru, V., Rao, M. (1998). Linear programming. *IIM Bangalore Research Paper*, (109), <https://doi.org/10.2139/ssrn.2170298>
- Kulhari, A. (2023). Significance of Linear Programming for Optimization. *International Journal of Advanced Research in Science, Communication and Technology (IJARSCT)*, 3(15), 179-183. <https://doi.org/10.48175/IJARSCT-10899>
- Dantzig, G. B. (1982). Reminiscences about the origins of linear programming. *Operations Research Letters*, 1(2), 43-48. [https://doi.org/10.1016/0167-6377\(82\)90043-8](https://doi.org/10.1016/0167-6377(82)90043-8)
- Gong, X. (2022). Optimization algorithm of logistics warehousing and distribution path based on artificial intelligence technology. In *2022 International Symposium on Advances in Informatics, Electronics and Education (ISAIEE)* (pp. 371-375).. <https://doi.org/10.1109/ISAIEE57420.2022.00083>
- Hebbar, N. (2020). Freshness of food detection using IoT and machine learning. In *2020 International Conference on Emerging Trends in Information Technology and Engineering (ic-ETITE)* (pp. 1-3). <https://doi.org/10.1109/ic-ETITE47903.2020.80>
- Hou, S., Zhu, D., Xu, J. (2022). Artificial intelligence, financial canteen and internal control: A case study of Chinese catering industry. In *2022 3rd International Conference on Electronic Communication and Artificial Intelligence (IWECAI)* (pp. 310-313). <https://doi.org/10.1109/IWECAI55315.2022.00066>



- Liaw, A., Wiener, M. (2002). Classification and Regression by randomForest. *R News*, 2(3), 18-22.
- Li, Y., Yan, H., Zhang, Y. (2019). A deep learning method for material performance recognition in laser additive manufacturing. In *2019 IEEE 17th International Conference on Industrial Informatics (INDIN)* (pp. 1735-1740). <https://doi.org/10.1109/INDIN41052.2019.8972334>
- Miltenberger, M. (2023). Linear Programming in MILP Solving a Computational Perspective. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0297-zib-91873>
- Misra, N. N., Dixit, Y., Al-Mallahi, A., Bhullar, M. S., Upadhyay, R., Martynenko, A. (2022). IoT, big data, and artificial intelligence in agriculture and food industry. *IEEE Internet of Things Journal*, 9(9), 6305-6324. <https://doi.org/10.1109/JIOT.2020.2998584>
- Nasteski, V. (2017). An overview of the supervised machine learning methods. *Horizons.B*, 4, 51-62. <https://doi.org/10.20544/HORIZONS.B.04.1.17.P05>
- Precup, R.-E., Hedrea, E.-L., Roman, R.-C., Petriu, E. M., Szedlak-Stinean, A.-I., Bojan-Dragos, C.-A. (2021). Experiment-based approach to teach optimization techniques. *IEEE Transactions on Education*, 64(2), 88-94. <https://doi.org/10.1109/TE.2020.3008878>
- Russell, S., Norvig, P. (2003). Artificial intelligence - a modern approach, 2nd Edition. Prentice Hall series in artificial intelligence.
- Sharma, A., Jain, A., Gupta, P., Chowdary, V. (2021). Machine learning applications for precision agriculture: A comprehensive review. *IEEE Access*, 9, 4843-4873. <https://doi.org/10.1109/ACCESS.2020.3048415>
- Tiwari, P., Agrawal, D. (2022). A study of linear programming technique. *International Journal of Statistics and Applied Mathematics*, 7(2), 54-56. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26343.52641>

## CONVECTIVE DRYING OF CHOKEBERRY CV. “VIKING” AND MODELING OF DRYING KINETICS

Nafiye ÜNAL<sup>1</sup>, Ahmet SÜSLÜ<sup>2</sup>, Recep KÜLCÜ<sup>3</sup>, Cüneyt DINCER<sup>4</sup>,  
Eda Elif YAVUZLAR İMİRĞİ<sup>5</sup>, Can ERTEKİN<sup>\*6</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, Antalya, Türkiye,

<sup>2</sup> Department of Agricultural Machinery and Technology Engineering, Faculty of Agriculture, Isparta University of Applied Sciences, Isparta, Türkiye

<sup>3</sup> Department of Agricultural Machinery and Technology Engineering, Faculty of Agriculture, Isparta University of Applied Sciences, Isparta, Türkiye

<sup>4</sup> Department of Food Processing, Finike Vocational School, Akdeniz University, Antalya, Türkiye

<sup>5</sup> Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, Antalya, Türkiye

<sup>6</sup> Department of Agricultural Machinery and Technologies Engineering, Faculty of Agriculture, Akdeniz University, Antalya, Türkiye

Received/Geliş: 30.01.2024; Accepted/Kabul: 17.09.2024; Published online/Online baskı: 23.09.2024

Ünal, N., Süslü, A., Külcü, R., Dincer, C., Yavuzlar, İmirgi E. E., Ertekin, C. (2024). Convective drying of chokeberry cv. “viking” and modeling of drying kinetics. GIDA (2024) 49 (5) 847-862 doi: 10.15237/gida.GD24019

Ünal, N., Süslü, A., Külcü, R., Dincer, C., Yavuzlar, İmirgi E. E., Ertekin, C. (2024). Aronyanın konvektif kurutulması ve kurutma kinetiğinin modellenmesi. GIDA (2024) 49 (5) 847-862 doi: 10.15237/gida.GD24019

### ABSTRACT

In this study, the effects of drying air temperatures (50, 60, 70, and 80°C) and velocities (0.5, 0.8, and 1.2 m/s) on chokeberry quality during convective drying were evaluated. The drying time decreased significantly with increasing drying air temperatures and velocities, from 2265 minutes at 50°C to 195 minutes at 80°C, and from 360 minutes at 0.5 m/s to 240 minutes at 1.2 m/s at 70°C. Higher drying air temperatures and velocities also enhanced the fruit color quality. The best antioxidant activity, anthocyanin, and phenolic content were achieved at 70°C with dryin air velocities between 0.5 m/s and 1.2 m/s. The Midilli et al. model provided the best fit for the drying kinetics, with high accuracy ( $R^2 \geq 0.9978$ ,  $\chi^2 \leq 0.0003$ ,  $RMSE \leq 0.0161$ ).

**Keywords:** Antioxidants, capacity, black chokeberries, drying, modeling, *Rosaceae*

### ARONYANIN KONVEKTİF KURUTULMASI VE KURUTMA KİNETİĞİNİN MODELLEMESİ

#### ÖZ

Bu çalışmada, konvektif kurutma sırasında farklı kurutma havası sıcaklıklarının (50, 60, 70 ve 80°C) ve hızlarının (0.5, 0.8 ve 1.2 m/s) aronya meyvesi kalitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Artan

\* Corresponding author/ Sorumlu yazar

✉: ertekin@akdeniz.edu.tr

☎: (+90) 242 310 2481

☎: (+90) 242 227 4564

Nafiye Ünal; ORCID no: 0000-0002-0853-6972

Ahmet Süslü; ORCID no: 0000-0003-4016-589X

Recep Külcü; ORCID no: 0000-0002-7185-6514

Cüneyt Dincer; ORCID no: 0000-0002-9160-4242

Eda Elif Yavuzlar İmirgi; ORCID no: 0000-0002-7304-7868

Can Ertekin; ORCID no: 0000-0003-2987-2438

sıcaklık ve hava hızı ile kuruma süresi önemli ölçüde azalmış; 50°C’de 2265 dakika olan süre, 80°C’de 195 dakikaya düşmüştür. 70°C’de ise 0.5 m/s’de 360 dakika olan süre, 1.2 m/s’de 240 dakikaya düşmüştür. Daha yüksek sıcaklık ve artan hava hızları meyve rengi kalitesini iyileştirmiştir. En yüksek antioksidan aktivitesi, toplam antosiyanin ve toplam fenolik içerik 70°C’de, 0.5 m/s ile 1.2 m/s hava hızları arasında elde edilmiştir. Kuruma kinetiklerinin tanımlanmasında ise Midilli ve ark. modeli yüksek doğrulukla uyum sağlamıştır ( $R^2 \geq 0.9978$ ,  $\chi^2 \leq 0.0003$ ,  $RMSE \leq 0.0161$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidanlar, kapasite, aronya, kurutma, modelleme, *Rosaceae*

## INTRODUCTION

Chokeberry [*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott] belongs to the family *Rosaceae* and is a berry fruit crop. Initially grown in north and northeastern Türkiye in 2012 (Boz and Poyraz Engin, 2019), its cultivation has expanded to the highlands of Central Anatolia and the Mediterranean regions in recent years. The primary reason for its growing popularity is its exceptionally high antioxidant capacity and anthocyanin content compared to other berry types (Oszmianski and Sapis, 1988; Wu et al., 2006; Kulling and Rawel, 2008). Chokeberry fruits are rich in polyphenols (Jeppsson and Johansson, 2000; Krawiec, 2008) and contain high levels of cyanidin-3-arabioside and cyanidin-3-galactoside (Borowska and Brzoska, 2016). Among more than 100 types of fruits, chokeberry ranks first in antioxidant capacity (Wu et al., 2006). One kilogram of fresh chokeberry fruit contains 2147 mg/100 g total anthocyanin content, significantly higher than blueberries (529-705 mg/100 g), raspberries (116-845 mg/100 g), and blackberries (353-433 mg/100 g FW) (Wu et al., 2006).

Chokeberry fruits also contain 14-28 mg/100 g vitamin C, 1.8-2.5 mg/100 g carotene, 0.05-0.1 mg/100 g vitamin B9, 0.5-0.8 mg/100 g vitamin E, 12-20% total soluble solids, 560-1050 mg/100 g FW total anthocyanin content, a pH of 3.3-3.7, and 0.7-1.2% titratable acidity (Jeppsson and Johansson, 2000). According to Kulling and Rawel (2008), the fruit consists of 74-80% water, 15.6-28.8% total soluble solids, 66-176 g/kg FW glucose and fructose, 3.4-5.8 g/kg FW pectin, 0.14% oil, and 13.1 g/kg FW malic acid. Horszwald et al. (2013) found that chokeberry powders are high in polyphenolic compounds.

Chokeberry's positive effects on human health have been noted, including benefits for cancer prevention, immune system support, digestive

health, heart problems, obesity, and diabetes (Gasiorowski et al., 1997; Kulling and Rawel, 2008; Tolic et al., 2015; Boz and Poyraz Engin, 2019; Sidor and Gramza-Michalowska, 2019). Globally, chokeberry fruits are consumed both fresh and processed into products such as jam, fruit juice, ice cream, energy drinks, tea, sauce, syrup, natural colorants, and nutritional supplements (Bussieres et al., 2008). In Türkiye, while fresh consumption is common, processing into fruit juice, ice cream, and yogurt has recently begun (Poyraz Engin et al., 2016). Due to the fruit's excessive sourness, bitterness, and astringency, exploring various drying and processing techniques is necessary.

Drying is a primary method of food preservation, and new methods are being tested on various materials in numerous studies (Sadowska et al., 2019). Recently, significant attention has been given to new drying and milling methods for producing powdered fruits and vegetables. Convective dryers are the most widely accepted method for drying fruits and vegetables (Oszmianski and Lachowicz, 2016). Sadowska et al. (2019) compared different drying techniques (freeze-drying, vacuum drying, convection drying, and high-energy air stream) using a laboratory convection dryer at 70°C for 48 hours. Calin-Sanchez et al. (2015) processed convective drying at 60°C with an air velocity of 0.8 m/s. Various drying techniques, including freeze, convective, vacuum microwave, and combined drying, have been used for black chokeberry fruits.

Petkovic et al. (2019) examined different convective drying processes (50, 60, and 70°C) for producing chokeberry powder. Samoticha et al. (2016) investigated the effects of different drying methods (convective, vacuum, freeze, microwave, and combined drying) on chokeberry fruit quality. Alterations in chemicals causing flavor and

nutrient loss were observed during convective drying (Krokida and Marinos-Kouris, 2003). Petkovic et al. (2019) found that at 50°C, a longer drying time and higher energy requirement were needed to produce chokeberry powder, but the best sensory characteristics were achieved compared to 60 and 70°C. Horszwald et al. (2013) stated that the quality of chokeberry powder may vary depending on the drying process applied. Drying fresh fruits promotes long-term consumption without spoilage. For example, the polyphenol content of chokeberry was studied in response to processing techniques by Hellstrom et al. (2007) and Mayer-Miebach et al. (2012). Samoticha et al. (2016) found that total phenolic and anthocyanin content in chokeberry fruits were more stable with microwave drying. However, only a few studies have focused on the convective drying of chokeberry and subsequent changes in its biochemical contents. Additionally, understanding the drying kinetics is critical for equipment design, process optimization, and product quality improvement. Mathematical model descriptions are important for enhancing process performance. These kinetic parameters can also be used to estimate the drying time of chokeberry to achieve a specific moisture content.

The objective of this study was to determine the optimal drying conditions to ensure the long-term quality of chokeberry fruits. Additionally, a preprint has previously been published.

## MATERIAL AND METHODS

### Material

In this study, 'Viking' [*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott] chokeberry was used and purchased from Konya, Türkiye (38° 10' 51.2" N, 32° 24' 57.5" E). Fruit samples were randomly collected in their black color maturity (20 August 2020) and analyzed in the laboratories of Akdeniz and Isparta Applied Sciences Universities.

### Drying experiments

The convective drying experiments were conducted using a laboratory dryer (Corvus, Turkey). In these experiments, the effects of drying air temperatures of 50, 60, 70, and 80°C at

a constant air velocity of 0.8 m/s, and the effects of air velocities of 0.5, 0.8, and 1.2 m/s at a constant air temperature of 70°C on the drying kinetics of chokeberry were measured. During the drying process, the weight of the samples was measured every 15 minutes to determine changes in moisture content. The effects of these conditions on color, antioxidant activity, total anthocyanin content, and total phenolic content were also investigated.

The reason for selecting an air velocity of 0.8 m/s is that this speed provides optimal conditions in many drying studies. Various studies have shown that an air velocity of 0.8 m/s optimizes drying time while preserving product quality (Erbay and Icier, 2010; Mujumdar, 2014; Vega-Gálvez et al., 2008). This air velocity is effective in maintaining the structural and chemical properties of sensitive products such as fruits and vegetables while ensuring sufficient drying speed.

Experiments conducted at different temperatures aimed to determine the most suitable temperature for drying chokeberry. The drying temperature significantly affects the evaporation rate of water content in the fruit and, consequently, the drying time. This study examined the effects of different temperatures on the drying kinetics, color, antioxidant activity, total anthocyanin content, and total phenolic content of chokeberry. The objective of the research is to determine the optimal drying temperature for chokeberry, thereby optimizing the drying process to be both efficient and protective of fruit quality.

### Mathematical modeling of drying processes

The 11 different models presented in Table 1 were used to describe the drying kinetics for the moisture ratio (MR, Eq. 1) data of the samples. Parameters in all models were decided using Sigma Plot 14.0 (Systat Software Inc., USA). Evaluation of the models was performed using the coefficient of determination ( $R^2$ ), reduced chi-squared ( $\chi^2$ ) value (Eq. 2) and root mean-square error (RMSE) (Eq. 3). These parameters were calculated using the following equations.

Table 1. Selected drying models for describing sample drying data

Model name	Model equation	Reference
Lewis	$MR = \exp(-k t)$	Ertekin and Firat, 2017
Henderson and Pabis	$MR = a \exp(-k t)$	Sonmete et al., 2017
Page	$MR = \exp(-k t^n)$	Yaldiz and Ertekin, 2001
Two-term	$MR = a \exp(-k_0 t) + b \exp(-k_1 t)$	Ertekin and Firat, 2017
Two-term exponential	$MR = a \exp(-k t) + (1-a) \exp(-k a t)$	Ertekin and Heybeli, 2014
Logarithmic	$MR = a \exp(-k t) + c$	Kayisoglu and Ertekin, 2011
Wang and Singh	$MR = 1 + a t + b t^2$	Ertekin and Firat, 2017
Midilli et al.	$MR = a \exp(-k t^n) + b t$	Menges et al., 2019
Verma et al.	$MR = a \exp(-k t) + (1-a) \exp(-g t)$	Karaaslan et al., 2021
Diffusion approach	$MR = a \exp(-k t) + (1-a) \exp(-k b t)$	Ertekin and Firat, 2017
Root of MR	$MR = (n + k t)^2$	Ertekin and Firat, 2017

*t*: drying time (min); MR: moisture ratio, *k*, *a*, *b*, *c*, *g*, *n*, *k<sub>0</sub>*, *k<sub>1</sub>* are model constants.

The moisture ratio (MR) of the samples during the drying processes was calculated according to Eq. (1):

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e} \quad (1)$$

Where  $M_0$  is the initial moisture content,  $M_t$  is the moisture content at any time ( $t$ , min), and  $M_e$  is the equilibrium moisture content during the drying process. The value of  $M_e$  was assumed as zero because it is lower than  $M_0$  or  $M_t$  (Dincer et al., 2022; Kayisoglu and Ertekin, 2011). Contents of all moisture were exemplified as kg water/kg dry matter.

$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (MR_{pre,i} - MR_{exp,i})^2}{n-z} \quad (2)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (MR_{pre,i} - MR_{exp,i})^2} \quad (3)$$

The predicted moisture ratio is  $MR_{pre,i}$ ; where  $n$  is the number of observations;  $MR_{exp,i}$  is the experimentally observed moisture ratio, and  $z$  is the number of constants in the models. The lower  $\chi^2$  and RMSE values together with  $R^2$  values close to 1 indicate better suited model of the data (Basar et al., 2019).

### Color measurement

Fruit skin colors (fresh and dried samples) were determined using a colorimeter (3NH NR20XE Precision, Shenzhen Threneh Technology Co., Ltd., China) in terms of “L” (whiteness=darkness), “a” (redness=greenness),

“b” (yellowness=blueness), C (chroma) and  $h^\circ$  (hue angle). According to the Nsonzi and Ramaswamy (1998), the total color difference ( $\Delta E$ ) was estimated as follows:

$$\Delta E = [(L-L_0)^2 + (a-a_0)^2 + (b-b_0)^2]^{1/2} \quad (4)$$

where  $L_0$ ,  $a_0$  and  $b_0$  demonstrate the brightness, redness, and yellowness of the dried samples, respectively.

### Preparation of extracts

Extraction was performed according to the method by Liu et al. (2016) with some alterations. One gram of the sample was weighed into a 50 mL centrifuge tube after being crushed with a blender (Beko BKK-2155 Maxi Hand Blender, Türkiye) and added to 20 mL of 60% ethyl alcohol (containing 0.1% HCl). The tubes were located in an ultrasonic bath (Caliskan Ultrasonic cleaner 180 W, 40 kHz, Türkiye) and extracted at 40 kHz and 30°C for 30 min. After the samples were centrifuged in a centrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810, Germany) for 10 min at 4000 rpm, the supernatant was taken. Extraction was replicated in triplicate. The filtrate was obtained and stored at 4°C until use.

### Determination of antioxidant activity using DPPH

Antioxidant activity was measured using the DPPH assay determined by Fernandez-Leon et al. (2013). From the sample extract, 50  $\mu$ L was added to 950  $\mu$ L of diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) solution ( $6 \times 10^{-5}$  M in methanol). The mixtures were shaken and saved in the dark at room

temperature for 30 min. Absorbances were recorded at 515 nm (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis, USA). Trolox was chosen as the standard of the study and the antioxidant activity was expressed in mg Trolox equivalent (TE) /kg.

#### *Total monomeric anthocyanin content (TAC)*

The total monomeric anthocyanin content was measured using a pH-differential method reported by Wang and Xu (2007) in combination with a two-buffer system that utilized potassium chloride buffer (0.025 M, pH 1.0) and sodium acetate buffer (0.4 M, pH 4.5). Extracts were diluted with buffers (pH 1 or 4.5) and incubated for 30 min at room temperature before absorbances were reported at 520 and 700 nm (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis, USA). Total anthocyanins were calculated as cyanidin-3-glucoside (mg/kg) according to the following Equation (1):

$$\text{Monomeric anthocyanin (mg/kg)} = A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000 / (\epsilon \times 1)$$

Where  $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1.0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4.5}$   
 : MW (molecular weight) = 449.2 g/mol for cyanidin-3-glucoside; DF = dilution factor; 1 = path length in cm;  $\epsilon = 26.900$  molar extinction coefficient in kg/ (mol·cm) for cyanidin-3-glucoside; 1000 = conversion from g to mg.

#### *Determination of total phenolic content (TPC)*

The total phenolic content was determined with the method by Dincer et al. (2013). 0.5 mL of the extract was treated with 2.5 ml of 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent and 2 mL of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 g/L). Then, the mixture was incubated in water bath at 50°C for 5 min and cooled in water bath at 25°C. The absorbance of the final solution was measured with a spectrophotometer (Thermo Scientific Evolution 160 UV-Vis, USA) at a

wavelength of 760 nm with respect to the blank solution (60% ethyl alcohol (including 0.1% HCl). The outcome was reported as gallic acid equivalents (mg GAE/kg).

#### **Statistical Analysis**

The studies were performed in a totally randomized design with three replications. Statistics were analyzed using SAS. The analysis of variance and LSD multiple range test was used to determine the significant differences in the means (95% confidence level).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Moisture content**

The drying process was carried out up to the final moisture content of 10% (w.b.). The effects of the drying air temperatures at the constant drying air velocity of 0.8 m/s are illustrated in Fig. 1. By increasing the temperature from 50°C to 80°C, the drying time decreased from 2265 minutes to 195 minutes. The drying time was 240, 285 and 360 min at the drying air velocities of 1.2, 0.8, and 0.5 m/s, respectively (Fig. 2). In different studies on chokeberry drying, Thi and Hwang (2016) found 12 hours by oven drying at 60°C and 7 days in sun drying. Petkovic et al. (2019) used the convective drying at 50, 60, and 70°C of chokeberry powders and estimated the drying time as 37 h at 50°C, 27 h at 60°C and 23 h at 70°C. Calin-Sanchez et al. (2015) found the shortest drying time to vary between 40 and 70 min with the vacuum microwave drying of chokeberry. Sadowska et al. (2017) found the drying time as 48 h at 50°C.

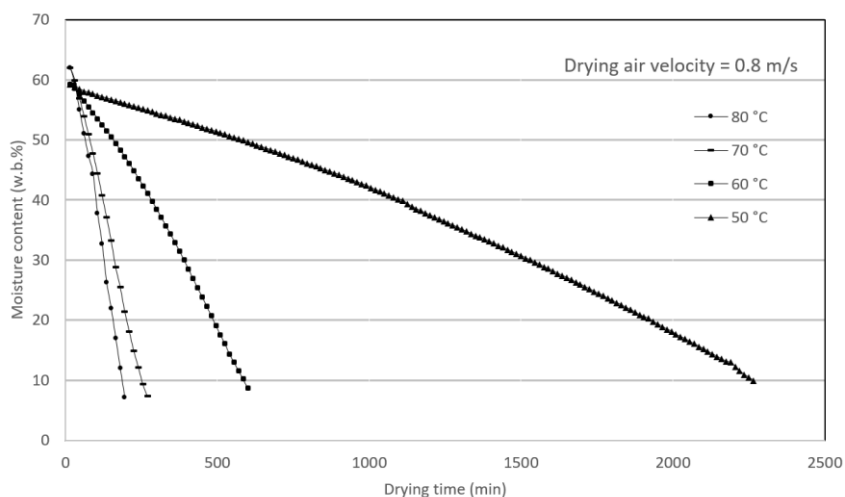


Fig. 1. The effect of drying air temperature on drying time of chokeberry.

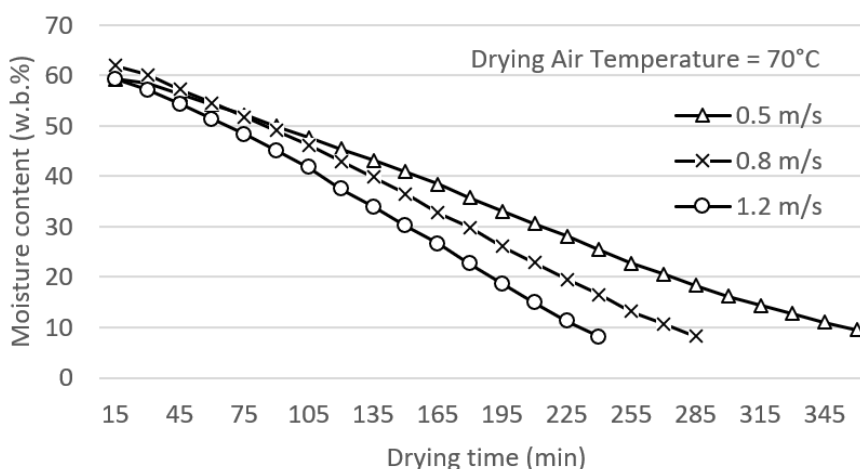


Fig. 2. The effect of drying air velocity on drying time of chokeberry.

### Fitting of experimental drying data to the models

The regression coefficients ( $R^2$ ), reduced chi-squared ( $\chi^2$ ) values and root mean-square error (RMSE) values, of all the models calculated to describe the experimental drying data were given in Table 2. The  $R^2$  values of the models varied between 0.9020 and 0.9997 for chokeberry. The  $\chi^2$  values of the models varied between 0.0001 and 0.9784, while RMSE values of the models varied between 0.005 and 0.1037 for chokeberry. The Midilli et al. model exhibited best fit for the drying kinetic data ( $R^2 \geq 0.9978$ ;  $\chi^2 \leq 0.0003$ ;  $RMSE \leq 0.0161$ ). Additionally, as seen from Fig. 3 the Midilli et al. model presented a successful

prediction for the drying characteristics of the sample when the experimental moisture ratios were compared with those predicted by the model. This was followed by Logarithmic, Wang and Singh, and Verma et al. models, respectively.

Martin-Gomez et al (2020) reported that Page model showed the better predictions for drying of blueberry. Shi et al (2008) stated that Thompson model gave better predictions for infrared drying of fresh and sugar-infused blueberries. On the other hand, Dincer et al. (2022) reported that the Midilli et al. model give a successful prediction for the drying characteristics of the black and white myrtle samples. In addition, Bingol et al. (2008),

who worked with grapes, reported that the Midilli et al. model showed the best fit to the experimental drying data.

The constants of the Midilli et al., Logarithmic, Wang and Singh, and Verma et al. models, which showed the best fit to the experimental drying data, were presented in Table 2. The k value of the

Midilli et al. model for chokeberry varied between 0.0019 and 0.2578 in the present study (Table 3). The k value of the dried chokeberry samples) increased with increasing temperature (50-80°C) and air velocity (0.5-1.2 m/s). Bingol et al. (2008) and Dincer et al. (2022) reported k values for grape between 0.001-0.010, and for myrtle samples between -0.0090-0.0620, respectively.

Table 2. Parameters of the kinetic models used to fit drying data for chokeberry dried by various drying temperatures and velocities.

		Lewis	Henderson and Pabis	Page	Two-term	Two-term exponential	Logarithmic
50°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9191	0.9453	0.9943	0.9488	0.9852	0.9970
	$\chi^2$	0.0065	0.0045	0.0005	0.0044	0.0012	0.0003
	RMSE	0.0808	0.0670	0.0216	0.0660	0.0348	0.0159
60°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9068	0.9363	0.9917	0.9415	0.9799	0.9966
	$\chi^2$	0.0073	0.0051	0.0007	0.0049	0.0016	0.0003
	RMSE	0.0854	0.0715	0.0258	0.0702	0.0401	0.0167
70°C, 0.5 m/s	R <sup>2</sup>	0.9020	0.9292	0.9916	0.9420	0.9768	0.9970
	$\chi^2$	0.0096	0.0073	0.0009	0.0068	0.0024	0.0003
	RMSE	0.0981	0.0857	0.0294	0.0823	0.0490	0.0181
70°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9199	0.9447	0.9955	0.9565	0.9861	0.9971
	$\chi^2$	0.0075	0.0055	0.0004	0.0048	0.0014	0.0003
	RMSE	0.0865	0.0738	0.0211	0.0695	0.0370	0.0174
70°C, 1.2 m/s	R <sup>2</sup>	0.9195	0.9443	0.9959	0.9577	0.9868	0.9971
	$\chi^2$	0.0075	0.0055	0.0004	0.0048	0.0013	0.0003
	RMSE	0.0867	0.0743	0.0201	0.0693	0.0362	0.0176
80°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9404	0.960	0.9974	0.9740	0.9941	0.9906
	$\chi^2$	0.0056	0.0040	0.0003	0.0031	0.0006	0.0010
	RMSE	0.0750	0.0632	0.0161	0.0554	0.0244	0.0321

		Wang and Singh	Midilli et al.	Verma et al.	Diffusion approach	Root of MR
50°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9964	0.9993	0.9964	0.9191	0.9814
	$\chi^2$	0.0003	5.5727E-05	0.0003	0.0068	0.0015
	RMSE	0.0171	0.0075	0.0174	0.0822	0.0391
60°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9988	0.9997	0.9986	0.9068	0.9738
	$\chi^2$	9.7840E-05	2.5460E-05	0.0001	0.0077	0.0021
	RMSE	0.0099	0.0050	0.0106	0.0875	0.0458
70°C, 0.5 m/s	R <sup>2</sup>	0.9969	0.9993	0.9968	0.9020	0.9733
	$\chi^2$	0.0003	7.7151E-05	0.0004	0.0108	0.0028
	RMSE	0.0180	0.0088	0.0188	0.1037	0.0526
70°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9959	0.9995	0.9959	0.9199	0.9826
	$\chi^2$	0.0004	5.7336E-05	0.0004	0.0084	0.0017
	RMSE	0.0202	0.0076	0.0208	0.0914	0.0414
70°C, 1.2 m/s	R <sup>2</sup>	0.9959	0.9996	0.9958	0.9195	0.9821
	$\chi^2$	0.0004	4.6332E-05	0.0004	0.0085	0.0018
	RMSE	0.0203	0.0068	0.0210	0.0924	0.0422
80°C, 0.8 m/s	R <sup>2</sup>	0.9881	0.9978	0.9879	0.9404	0.9890
	$\chi^2$	0.0012	0.0003	0.0013	0.0065	0.0011
	RMSE	0.0346	0.0161	0.0364	0.0805	0.0334



Table 3. Kinetic parameters of selected models for chokeberry samples

Mathematical Model	Drying conditions	Model constants				
		A	k	b	n	g
Midilli et al.	50°C, 0.8m/s	0.9741	0.0019	-0.0027	1.6218	
	60°C, 0.8m/s	0.9913	0.0164	-0.0368	1.6146	
	70°C, 0.5m/s	0.9893	0.0945	-0.0582	1.6040	
	70°C, 0.8m/s	0.9889	0.1254	-0.0363	1.5519	
	70°C, 1.2 m/s	0.9910	0.1449	-0.0406	1.5559	
	80°C, 0.8m/s	0.9816	0.2578	0.0044	1.6617	
Logarithmic	50°C, 0.8m/s	1473.8414	1.1202E-005	-1472.8188		
	60°C, 0.8m/s	4990.2922	1.7832E-005	-4989.2516		
	70°C, 0.5m/s	2303.1178	9.1882E-005	-2302.0819		
	70°C, 0.8m/s	14.5429	0.0147	-13.5150		
	70°C, 1.2 m/s	2311.7200	9.8947E-005	-2310.6945		
	80°C, 0.8m/s	2.2095	0.1530	-1.1673		
Wang and Singh	50°C, 0.8m/s	-0.0148		-2.4640E-005		
	60°C, 0.8m/s	-0.0678		-0.0019		
	70°C, 0.5m/s	-0.1750		-0.0070		
	70°C, 0.8m/s	-0.1908		-0.0023		
	70°C, 1.2 m/s	-0.2071		-0.0039		
	80°C, 0.8m/s	-0.2918		0.0119		
Verma et al.	50°C, 0.8m/s	-106.7720	-0.0015			-0.0014
	60°C, 0.8m/s	-100.5536	-0.0210			-0.0202
	70°C, 0.5m/s	-107.6427	-0.0325			-0.0306
	70°C, 0.8m/s	-80.2464	-0.0123			-0.0098
	70°C, 1.2 m/s	90.9108	-0.0153			-0.0178
	80°C, 0.8m/s	-74.2250	0.0451			0.0484

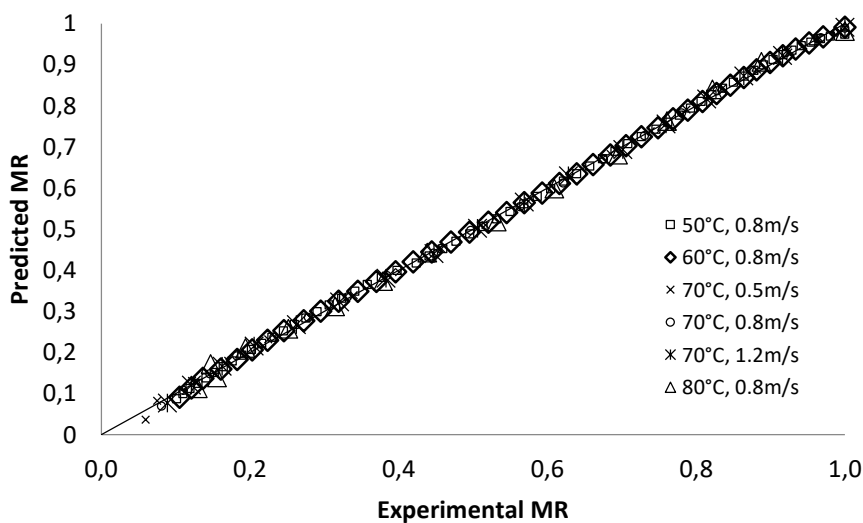


Fig. 3. Experimental and predicted values of MR change in chokeberry for the Midilli et al. model

**Color (L, a, b, C, h°, ΔE)**

Fig. 4 and Fig. 5 give the results of fruit color values as L (lightness), a (redness), b (yellowness), C (chroma value), h° (hue angle) and ΔE (color difference) at the constant drying air velocity of 0.8 m/s for different drying air temperatures. Among the examined applications, it is stated that, while statistical differences are found insignificant in terms of L value, found significant in terms of a and b values. In addition, it can be said that increasing drying air temperature raised the a and b values statistically. Depending on the

applications, L values ranged from 19.14 to 20.13, a value from 1.11 to 5.03, b value from -1.30 to 2.98 (Fig. 4).

Statistical differences are found significant in terms of C value. The lowest color intensity (C) was in the fresh fruits with 1.85, while the highest value was measured at 80 °C with 5.69. Therefore, it was found that, drying increased C value of the fruit. Statistically, the highest C value was found at 60, 70 and 80°C, respectively (Fig. 5).

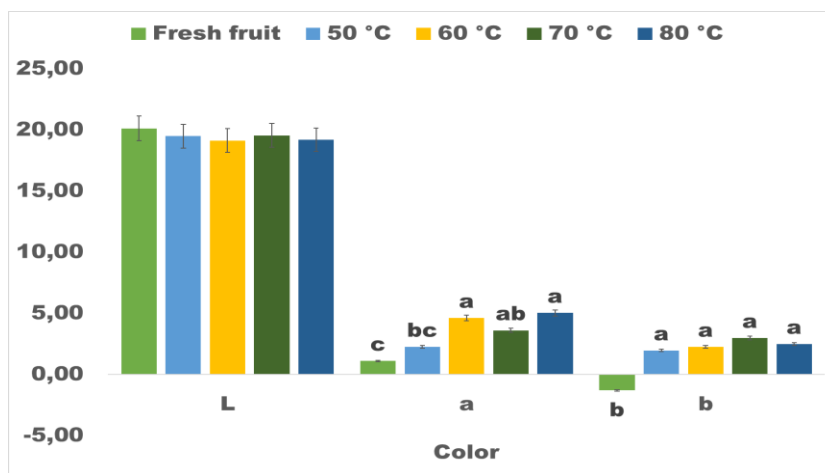


Fig. 4. L, a, b changes at air velocity 0.8 m·s<sup>-1</sup>, different air temperatures.

\*Different letters of upper index within the column show significant differences at  $P < 0.05$ . The columns without letters demonstrated no significant statistical differences.

LSD<sub>L</sub> = NS, LSD<sub>a</sub> = 2.247, LSD<sub>b</sub> = 1.666

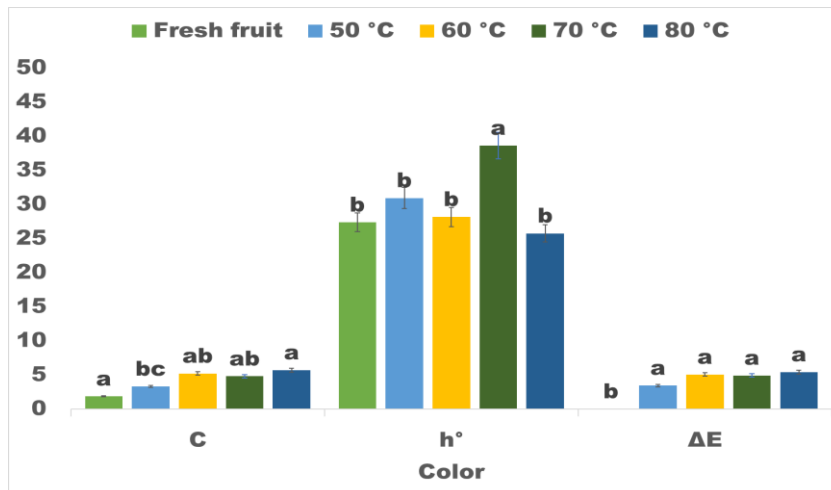


Fig. 5. C, h° and ΔE changes at air velocity 0.8 m·s<sup>-1</sup>, different air temperatures.

\*Different letters of upper index within the column show significant differences at  $P < 0.05$

The columns without letters demonstrated no significant statistical differences.

LSD<sub>C</sub> = 2.093, LSD<sub>h°</sub> = 5.344, LSD<sub>ΔE</sub> = 2.173

It is seen that,  $h^\circ$  value of the fruit in drying process was affected by drying air temperatures. Nevertheless, the highest  $h^\circ$  value was stated by 38.61; the lowest was stated at 80°C in the experiment. On the other hand, among the different drying air temperatures, there was no significant difference stated in terms of  $\Delta E$  values. These values changed between 3.43 and 5.40 depending on different treatments (Fig. 5).

Consequently, all the applied treatments increased a, b, C values compared to fresh fruits. The highest a, b, C values were determined specifically at drying air temperature of 80°C.

Fig. 6 and Fig. 7 give the results of fruit color values as L (lightness), a (redness), b (yellowness), C (chroma value),  $h^\circ$  (hue angle) and  $\Delta E$  (color difference) at constant drying air temperatures of 70°C and different drying air velocities. Statistical differences were found insignificant in terms of L value, changing between 19.45 and 20.16. All the tried different drying air velocity treatments increased a and b values compared to fresh fruits. As a matter of fact, the lowest a (1.11) and b (-1.03) values determined in fresh fruits. The highest a (5.12) and b (3.85) values were stated at drying air velocity of 1.2 m/s (Fig. 6).

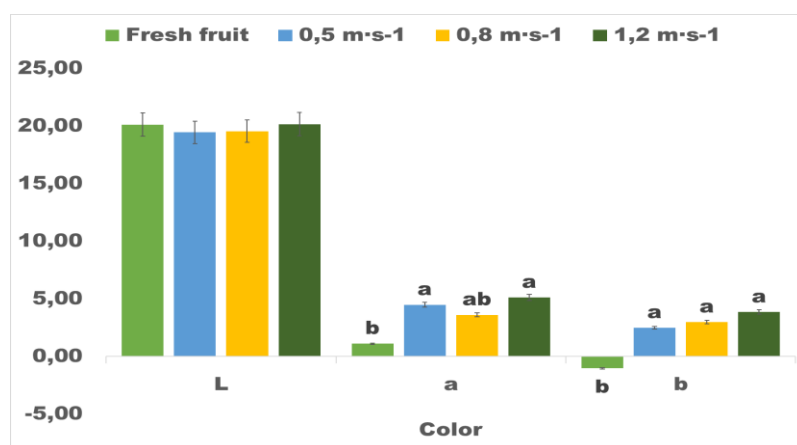


Fig. 6. L, a and b changes at air temperature 70°C, different air velocity.

\*Different letters of upper index within the column show significant differences at  $P < 0.05$ .

The columns without letters demonstrated no significant statistical differences.

$LSD_L = NS$ ,  $LSD_a = 2.645$ ,  $LSD_b = 3.499$

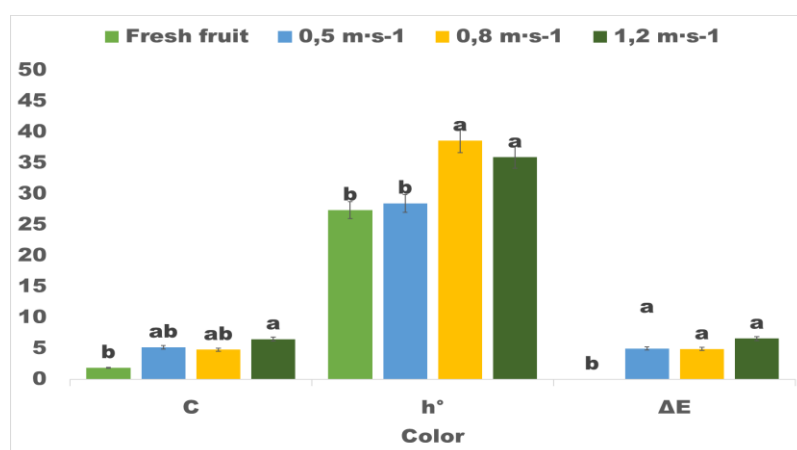


Fig. 7. C,  $h^\circ$  and  $\Delta E$  changes at air temperature 70°C, different air velocity.

\*Different letters of upper index within the column show significant differences at  $P < 0.05$ .

The columns without letters demonstrated no significant statistical differences.

$LSD_C = 4.044$ ,  $LSD_{h^\circ} = 6.090$ ,  $LSD_{\Delta E} = 4.082$

Effects of the treatments on fruit color C values were found statistically significant (Fig. 7). All the applied drying air velocities increased C value compared to fresh fruits. Additionally, the highest C value was determined at 6.50 and 1.2 m/s drying air velocity. There was significant difference in terms of  $h^{\circ}$  value among the drying air velocity treatments.  $\Delta E$  changed between 0.00 and 6.61 depending on the treatments. There was no significant difference in terms of  $\Delta E$  values among the drying air velocity treatments (Fig. 7). There is one study about fruit color changes of processed chokeberry powders (Sadowska et al., 2019). Sadowska et al. (2019) stated the highest L (18.10), a (9.20) and b (4.57) values of chokeberry powders color via high energy air stream drying method in this study on which they compared freeze-drying, vacuum drying, convection drying. Besides L value is 15.05, a value is 4.75 and b value is 1.76 in convection drying (CD) method. Adak et al. (2017) indicated that, increasing drying air temperature lowered the L, a, b and C values, but the  $h^{\circ}$  increased small amount for infrared drying of strawberries. In the same research, it was also stated that regarding to the drying air velocity of 1.0 m/s was found as the best in terms of L, a, b, C,  $h^{\circ}$  and  $\Delta E$  values compared to the 1.5 and 2.0 m/s and increasing air velocity had led to decrease in lightness, color intensity but not the color which showed an increase. Samoticha et al. (2016) indicated that, the drying process caused alterations in the appearance and brightening of color and raised the contribution of yellow color in the fruits at higher levels.

As a consequence, all the applied drying air velocity treatments increased a, b and C values compared to fresh fruits. Particularly, 1.2 m/s drying air velocity stands out with high a, b and C values.

#### **Antioxidant Activity, Total Anthocyanins, Total Phenolic Content**

Effects of different drying air temperature under constant drying air velocity of 0.8 m/s on fruit biochemical features are shown in Table 4. As given in Table 4, significant statistical differences in terms of antioxidant activity, total anthocyanin

(TAC) and total phenolic content (TPC) were determined.

According to findings, drying air temperatures affected the biochemical content in a dramatic way. In fact, all the drying air temperatures proportionally increased antioxidant activity, total anthocyanin content and total phenolic content in dried fruits compared to the fresh ones because significant water was removed from the dried samples. In general, it is observed that antioxidant activity, phenolic and anthocyanin content increase proportionally with the temperature increase from 50 °C to 70 °C, and decreases slightly at 80 °C compared to 70 °C. The highest antioxidant activity (3105.60 mg TE/kg FW), total anthocyanin content (115.83 mg·Cyd-3-glu/kg) and total phenolic content (918.52 mg GAE/kg) were found at drying air temperature of 70°C. In this study, specifically 70°C drying air temperature stands out in terms of this qualities. These findings were similar to Adak et al. (2017)'s results. Adak et al. (2017) indicated that, infrared drying of strawberries increased antioxidant activity, total anthocyanin and phenolic contents of the fruits compared to fresh forms. They reported the highest antioxidant activity, phenolic and anthocyanin content in samples dried at 60 °C. It was stated that these values were lower in samples dried at 80 °C and 100 °C, compared to 60 °C (Adak et al. 2017).

Effect of different drying air velocities at constant drying air temperature of 70°C on nutritional fruit quality characteristics of chokeberries were indicated in Table 5. As shown in Table 5, significant statistical differences were found in terms of all examined features among the treatments. The lowest antioxidant activity was found in fresh fruits (1680.0 mg TE/kg) and the highest value was found at drying air velocity of 1.2 m/s (3140.00 mg TE/kg). In other words, with the increased drying air velocity from 0.5 m/s to 1.2 m/s, antioxidant activity in fruits proportionally increased (Table 5).

When the results examined in terms of total anthocyanin content, all the drying air velocities proportionally increased this value compared to

fresh fruits. As a matter of fact, the lowest total anthocyanin content was stated in fresh fruits (66.04 mg Cyd-3-glu kg<sup>-1</sup> FW). Total anthocyanin content decreased depending on the drying air velocity rise, however, that decrease statistically

made no difference. These values varied between 105.31 mg Cyd-3-glu/kg FW and 117.67 mg Cyd-3-glu /kg FW depending on drying air velocities (Table 5).

Table 4. Effect of different air temperature, at air velocity 0.8 m·s<sup>-1</sup> on nutritional fruit quality characteristics of chokeberries.

Treatments	Antioxidant Activity <sup>A</sup> (mg TE/kg)	Total anthocyanin content (TAC) <sup>B</sup> (mg Cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	Total phenolic content (TPC) <sup>C</sup> (mg GAE kg <sup>-1</sup> )
Fresh fruit	1680.0 d	66.04 c	278.09 c
50 °C	2496.7 c	52.15 c	734.88 b
60 °C	2772.3 b	106.79 ab	873.15 a
70 °C	3105.6 a	115.83 a	918.52 a
80 °C	2906.9 ab	81.60 bc	877.47 a
LSD <sub>0.05</sub>	247.66	30.734	123.79

\*Values in the same column that are followed by different letters are significantly different (p<0.05) using LSD comparison test.

<sup>A</sup> The antioxidant activity was analyzed by DPPH assay according to the procedure of Fernández-León et al. (2013). Values were expressed as mg TE kg<sup>-1</sup>.

Antioxidant activity was analyzed using the DPPH assay described by Fernández-León et al. (2013).

<sup>B</sup> Total monomeric anthocyanin content was calculated using a pH-differential method described by Wang and Xu (2007). Values were expressed as mg Cyd-3-glu kg<sup>-1</sup> by spectrophotometer.

<sup>C</sup> The total phenolic content analyses were performed using the method described by Dincer et al. (2013). Values were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) kg<sup>-1</sup> by spectrophotometer.

\*\*The results based on as wet basis for fresh fruit and dry weight for dried fruits.

Table 5. Effect of different air velocity at air temperature 70°C on nutritional fruit quality characteristics of chokeberries.

Treatments	Antioxidant Activity <sup>A</sup> (mg TE/kg)	Total anthocyanin content (TAC) <sup>B</sup> (mg·Cyd-3-glu kg <sup>-1</sup> )	Total phenolic content <sup>C</sup> (TPC) (mg·GAE kg <sup>-1</sup> )
Fresh fruit	1680.00 b	66.04 b	278.09 b
0.5 m·s <sup>-1</sup>	2938.97 a	117.67 a	909.57 a
0.8 m·s <sup>-1</sup>	3105.64 a	115.83 a	918.52 a
1.2 m·s <sup>-1</sup>	3140.00 a	105.31 a	917.28 a
LSD <sub>0.05</sub>	241.200	26.132	118.910

\*Values in the same column that are followed by different letters are significantly different (p<0.05) using LSD comparison test.

<sup>A</sup> The antioxidant activity was analyzed by DPPH assay according to the procedure of Fernández-León et al. (2013). Values were expressed as mg TE kg<sup>-1</sup>.

Antioxidant activity was analyzed using the DPPH assay described by Fernández-León et al. (2013).

<sup>B</sup> Total monomeric anthocyanin content was calculated using a pH-differential method described by Wang and Xu (2007). Values were expressed as mg Cyd-3-glu kg<sup>-1</sup> by spectrophotometer.

<sup>C</sup> The total phenolic content analyses were performed using the method described by Dincer et al. (2013). Values were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) kg<sup>-1</sup> by spectrophotometer.

\*\*The results based on as wet basis for fresh fruit and dry weight for dried fruits.

The effects of all the applied drying processes on total phenolic content (TPC) of fruits were found statistically significant. While the lowest TPC was stated in fresh fruit (278.09 mg GAE /kg FW), all the applied drying air velocities increased TPC compared to fresh forms. These values, also, varied between 909.57 mg GAE /kg DW and 918.52 mg GAE/kg DW (Table 5).

Current findings indicated that, at constant drying air temperature of 70°C with different drying air velocity treatments affected the biochemical content of fruits in a significant way compared to fresh ones. In fact, the lowest values of antioxidant activity, TAC and TPC were found in fresh fruits. Therefore, all the drying air velocity treatments from 0.5 m/s to 1.2 m/s can be suggested as their positive effects on biochemical fruit contents.

In this concern, some scholars have reported different results. The reason of these differences is the usage of different drying techniques and differently processed fruits.

In this regard, findings of this study was found partly similar to strawberry drying study Adak et al. (2017). Hence, these researchers stated that convective drying treatment increased biochemical content compared to the fresh fruits. Additionally, the researchers indicated that, increasing drying air velocity from 1 m/s to 2 m/s caused decrease in total anthocyanin and total phenol contents, but increase in the antioxidant activity. In this study, change of the drying air velocity did not affect the antioxidant activity, total anthocyanin and total phenol contents. Petkovic et al. (2019) used 50, 60 and 70°C of convective drying temperatures for chokeberry powders and suggested 50°C in terms of bioactive components (anthocyanins, flavonoids, phenols) and antioxidant activity. They stated the results as the drying air temperature of 50°C had the highest ratio of total anthocyanins ( $376.89 \pm 5.73$  mg Cyn-3-glu [100 g dm]<sup>-1</sup>), total flavonoids ( $1037.19 \pm 3.83$  mg CE [100 g dm]<sup>-1</sup>), phenols ( $1918.79 \pm 3.26$  mg GAE [100 g dm]<sup>-1</sup>) and antioxidant activity ( $37.11 \pm 0.28$  mg TE [100 g dm]<sup>-1</sup>). On the other hand, findings showed that, rising

temperature increased the biochemical content. In fact, the highest values of antioxidant activity, total anthocyanin and total phenolic content are stated at 70°C drying air temperature.

Calin-Sanchez et al. (2015) reported that, vacuum microwave and combined drying were found as the best two different drying techniques of black chokeberry fruit. This suggestion led to shorter drying time (40-70 min). Sadowska et al. (2019) applied freeze, vacuum, convection and high energy air stream drying on chokeberry powders. According to their results, high energy air stream drying was the best method in terms of vitamin C ( $80.57$  mg [100 g dry matter]<sup>-1</sup>), polyphenol contents ( $2484.60$  mg GAE [100 g dry matter]<sup>-1</sup>), antioxidant activity ( $58.91$  mmol Trolox [100 g dry matter]<sup>-1</sup>), and anthocyanin ( $1035.51$  mg [100 g dry matter]<sup>-1</sup> Cyanidin-3,5-digalactoside). In addition, Horszwald et al. (2013) were stated that, there was a correlation between bioactive compounds and antioxidant capacity. In other studies, Samoticha et al. (2016) indicated that, the highest content of bioactive compounds and antioxidant activity were found in freeze-dried samples, compared with fresh fruits. In addition, the rise in drying air temperature during convective drying as well as the increase in material temperature during microwave drying deteriorated the dried product quality in terms of the content of phenolic compounds, antioxidant activity and color.

## CONCLUSION

To sum up, among the proposed models, the Midilli et al. equation exhibited the best fit for predicting the drying behavior of chokeberry samples. It is suggested to use the convective drying system under specific conditions of 70°C and an air velocity of 0.8 m/s to attain high nutritive biochemical features, high fruit quality, and suitable drying time, in addition to good consumer acceptance of dried chokeberries. These conditions were found to optimize the drying process by providing sufficient drying speed while maintaining the structural and chemical properties of the fruit. Besides, drying chokeberries under these conditions provides

both shelf stability and flexibility in different processing techniques.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was partially supported by the Scientific Research Administration Unit of Akdeniz and Isparta Uygulamalı Bilimler Universities, Antalya and Isparta-Türkiye.

#### PREPRINT

A version of this study has previously been published as a preprint in Research Square (Suslu et al., 2022).

#### AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Nafiye Ünal: Investigation, conceptualization, writing-review and editing, Ahmet Süslü: methodology, resources, data curation, Recep Külcü: investigation, resources, Cüneyt Dincer: methodology, data curation, writing-review and editing, Eda Elif Yavuzlar İmirgi: methodology, Can Ertekin: project administration, conceptualization, investigation, visualization, supervision, writing-review and editing

#### FUNDING

No funding was obtained for this study.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

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

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data presented in this study are not available in this article.

#### REFERENCES

Adak, N., Heybeli, N., Ertekin, C. (2017). Infrared drying of strawberry. *Food Chemistry*, 219:109-116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.103>

Basar, E.K., Heybeli, N., Firat, M.Z., Ertekin, C. (2019). Nonlinear models for infrared drying of mint. *Latin American Applied Research, An International Journal* 49: 19-24.

Bingol, G., Pan, Z., Roberts, J.S, Devres, Y.O., Balaban, M.O. (2008). Mathematical modeling of microwave-assisted convective heating and drying of grapes. *Int J Agric Biol Eng*, 1 (2), 46-54.

Borowska, S., Brzoska, M.M. (2016). Chokeberries (*Aronia melanocarpa*) and their products as a possible means for the prevention and treatment of noncommunicable diseases and unfavorable health effects due to exposure to xenobiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (6):982-1017. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12221>

Boz, Y., Poyraz Engin, S. (2019). Aronya (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) meyvesinin insan sağlığı üzerine etkileri. VI. Ulusal Üzümü Meyveler Sempozyumu 5-7 Eylül 2019, Samsun, sayfa 35 (In Turkish).

Bussieres, J., Boudreau, S., Clement–Mathieu, G., Dansereau, B., Rochefort, L. (2008). Growing black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) in cut-over peatlands. *HortScience*, 43 (2):6. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.2.494>

Calin-Sanchez, A., Kharaghani, A., Lech, K., Figiel, A., Carbonell-Barrachina, A.A., Tsotsas, E. (2015). Drying kinetics and microstructural and sensory properties of black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) as affected by drying method. *Food Bioprocess Technology*, 8:6 3–74. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1383-x>

Dincer, C., Dogan, A., Erkan, M. (2022). Effect of various drying methods on drying characteristics of black and white myrtle fruits (*Myrtus communis* L.). *Erverbs-Obstbau*, 64 (3):433-443.

Dincer, C., Tontul, I., Cam, I.B., Ozdemir, K.S., Topuz, A., Nadeem, H.S., Gokturk, R.S. (2013). Phenolic composition and antioxidant activity of *Salvia tomentosa* Miller: Effects of cultivation, harvesting year, and storage. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37 (5):561–567. <https://doi.org/10.3906/tar-1211-72>

Erbay, Z. and Icier, F. (2010) A Review of Thin Layer Drying of Foods: Theory, Modeling and Experimental Results. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 441-464.

- Ertekin, C., Firat, M.Z. (2017). A comprehensive review of thin-layer drying models used in agricultural products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57: 701-717.
- Ertekin, C., Heybeli, N. (2014). Thin-layer infrared drying of mint leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38: 1480-1490.
- Fernandez-Leon, M.F., Fernandez-Leon, A.M., Lozano, M., Ayuso, M.C., Amodio, M.L., Colelli, G., Gonzalez-Gomez, D. (2013). Retention of quality and functional values of broccoli 'Parthenon' stored in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 31 (2):302-313. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.012>
- Gasiorowski, K., Szyba, K., Brokos, B., Kolaczynska, B., Jankowiak-Wlodarczyk, M., Oszmianski, J. (1997). Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. *Cancer Letters* 119:37-46. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00248-6)
- Hellstrom, J., Rajaniemi, S., Kivijarvi, P., Mattila, P. (2007). The effect of processing on chokeberry (*Aronia Medik.*) polyphenols. In: NJF Report, *Nordic Association of Agricultural Scientists* 3 (1):40-41.
- Horszwald, A., Julien, H., Andlauer, W. (2013). Characterisation of Aronia powders obtained by different drying processes. *Food Chemistry*, 141 (3):2858-2863. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.103>
- Jeppsson, N., Johansson, R. (2000). Changes in fruit quality in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) during maturation. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75 (3):340-345. <https://doi.org/10.1080/14620316.2000.11511247>
- Karaaslan, S., Ekinci, K., Ertekin, C., Kumbul, B.S. (2021). Thin Layer Peach Drying in Solar Tunnel Drier. *Erwerbs-Obstbau*, 63: 65-73.
- Kayisoglu, S., Ertekin, C. (2011). Vacuum drying kinetics of barbunya bean. *Philippine Agricultural Scientist*, 94: 285-291.
- Krawiec, P. (2008). Effects of biostimulators on growth, cropping and fruit quality of chokeberry. Biostimulators in modern agriculture. *Fruit Crops Warsaw*, 42-48.
- Krokida, M.K., Marinos-Kouris, D. (2003). Rehydration kinetics of dehydrated products. *Journal of Food Engineering* 57:1-7. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00214-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00214-5)
- Kulling, S.E., Rawel, H.M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Medica*, 74: 1625-1634. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088306>
- Liu, S., Xu, Q., Li, X., Wang, Y., Zhu, J., Ning, C., Meng, X. (2016). Effects of high hydrostatic pressure on physicochemical properties, enzymes activity, and antioxidant capacities of anthocyanins extracts of wild *Lonicera caerulea* berry. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 36: 48-58. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.001>
- Martin-Gomez, J., Varo, M.A., Merida, J., Serratos, M.P. (2020). Influence of drying processes on anthocyanin profiles, total phenolic compounds and antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *LWT Food Sci Technol*, 120, 108931. [doi:10.1016/j.lwt.2019.108931](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108931)
- Mayer-Miebach, E., Adamiuk, M., Behsnilian, D. (2012). Stability of chokeberry bioactive polyphenols during juice processing and stabilization of a polyphenol-rich material from the by-product. *Agriculture*, 2: 244-258. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030244>
- Menges, H.O., Unver, A., Ozcan, M.M., Ertekin, C. (2019). The Effects of drying parameters on drying characteristics, colorimetric differences, antioxidant capacity and total phenols of sliced kiwifruit. *Erwerbs-Obstbau*, 61: 195-207.
- Mujumdar, A.S. (2014). Handbook of Industrial Drying, Fourth Edition. CRC Press, ISBN 1466596651, 9781466596658, 1348 pages.
- Nsonzi, F., Ramaswamy, H. S. (1998). Quality evaluation of osmo-convective dried blueberries. *Drying Technology*, 16: 705-723.
- Oszmianski, J., Lachowicz, S. (2016). Effect of the production of dried fruits and juice from



- chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on the content and antioxidative activity of bioactive compounds. *Molecules*, 21(8): 1098. <https://doi.org/10.3390/molecules21081098>
- Oszmianski, J., Sapis, J.C. (1988). Anthocyanins in fruits of *Aronia melanocarpa* (chokeberry). *Journal of Food Science*, 53: 1241-1242. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13577.x>
- Petkovic, M., Durovic, I., Miletic, N., Radovanovic, J. (2019). Effect of convective drying method of chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.) on drying kinetics, Bioactive Components and Sensory Characteristics of Bread with Chokeberry Powder. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 63(4): 600-608, <https://doi.org/10.3311/PPCh.13783>
- Poyraz Engin, S., Mert, C., Fidancı A., Boz, Y. (2016). Aronya (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) meyve türünde morfolojik incelemeler. *Bahçe*, 45(2): 71-78 (In Turkish).
- Sadowska, A., Swiderski, F., Rakowska, R., Hallmann, E. (2019). Comparison of quality and microstructure of chokeberry powders prepared by different drying methods, including innovative fluidised bed jet milling and drying. *Food Science and Biotechnology*, 28: 1073-1081. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00556-1>
- Sadowska, K., Andrzejewska, J., Kloska, L. (2017). Influence of freezing, lyophilisation and air drying on the total monometric anthocyanins, vitamin C and antioxidant capacity of selected berries. *International Journal of Food Science and Technology*, 52: 1246-1251. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13391>
- Samoticha, J., Wojdyło, A., Lech, K. (2016). The influence of different the drying methods on chemical composition and antioxidant activity in chokeberries. *LWT- Food Science and Technology*, 66: 484-489. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.073>
- Shi, J., Pan, Z., McHugh, T.H., Wood, D., Hirschberg, E., Olson, D. (2008). Drying and quality characteristics of fresh and sugar-infused blueberries dried with infrared radiation heating. *LWT Food Sci Technol*, 41 (10):1962-1972. doi: 10.1016/j.lwt.2008.01.003.
- Sidor, A., Gramza-Michalowska, A. (2019). Black chokeberry *Aronia melanocarpa* L.-A qualitative composition, phenolic profile and antioxidant potential. *Molecules* 24 (20):3710. <https://doi.org/10.3390/molecules24203710>
- Sonmete, M.H., Menges, H.O., Ertekin, C., Ozcan, M.M. (2017). Mathematical modeling of thin layer drying of carrot slices by forced convection. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11: 629-638.
- Thi, N.D., Hwang, E.S. (2016). Effects of drying methods on contents of bioactive compounds and antioxidant activities of black chokeberries (*Aronia melanocarpa*). *Food Science and Biotechnology*, 25: 55-61. <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0008-8>
- Tolic, M.T., Jurcevic, I.L., Krbavcic, I.P., Markovic, K., Vahcic, N. (2015). Phenolic content, antioxidant capacity and quality of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) products. *Food Technology and Biotechnology*, 53 (2):171-179. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.02.15.3833>
- Wang, W.D., Xu, S.Y. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82 (3):271-275. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.018>
- Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2006). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (1):4069-4075. <https://doi.org/10.1021/jf060300l>
- Yaldiz, O., Ertekin, C. (2001). Thin layer solar drying of some vegetables. *Drying Technology*, 19 (3-4):583-597. doi:10.1081/DRT-100103936

## BAKLA PROTEİNİ: MİKRODALGA DESTEKLİ ÖZÜTLEME KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU VE KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİNİN PEYNİRALTI SUYU PROTEİNİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

**Mehmet Şükrü KARAKUŞ\***

Harran Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Şanlıurfa, Türkiye

Geliş/Received: 24.11.2023; Kabul /Accepted: 20.09.2024; Online baskı /Published online: 25.09.2024

Karakuş, M. Ş. (2024). Bakla proteini: Mikrodalga destekli özütleme koşullarının optimizasyonu ve karakteristik özelliklerinin peyniraltı suyu proteini ile karşılaştırılması. *GIDA* (2024) 49 (5) 863-878 doi: 10.15237/gida.GD23134

*Karakuş, M. Ş. (2024). Faba bean protein: Optimization of microwave-assisted extraction conditions and comparison of its characteristics with whey protein. GIDA (2024) 49 (5) 863-878 doi: 10.15237/gida.GD23134*

### ÖZ

Bu çalışmada bakla proteini konsantresinin (BP) mikrodalga destekli özütleme işlemi, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Mikrodalga gücü (250-500 W) ve işlem süresi (10-60 dakika) bağımsız değişkenler olarak seçilmiş ve bu parametrelerin protein verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. En yüksek protein verimi (%47.74), 481.70 W mikrodalga gücünde ve 50.68 dakika işlem süresinde elde edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen BP'nin karakteristik özellikleri ticari peyniraltı suyu proteini (PSP) ile kıyaslanmıştır. Proteinlerin karakteristik bağ yapıları fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile doğrulanmış ve molekül ağırlıkları sodyum dodesil-sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-page) ile tespit edilmiştir. BP ve PSP'nin çözünürlük değerleri sırasıyla %80.23 ve %91.12 olarak belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). BP'nin köpük oluşturma özellikleri, emülsifiye edici davranışları ve stabilite katsayısı PSP'den daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar bitkisel proteinlerin gıda sistemlerinde alternatif protein kaynağı olarak değerlendirileceğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bakla proteini konsantresi, peyniraltı suyu proteini, FTIR, moleküler ağırlık, emülsiyon

## FABA BEAN PROTEIN: OPTIMIZATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION CONDITIONS AND COMPARISON OF ITS CHARACTERISTICS WITH WHEY PROTEIN

### ABSTRACT

In this study, microwave-assisted extraction of faba bean protein (BP) concentrate was optimized through the response surface methodology. Microwave power (250-500 W) and processing time (10-60 min) were chosen as independent variables and the effect of these parameters on protein yield was investigated. The highest protein yield (47.74%) was achieved at 481.70 W microwave power and 50.68 min processing time. The characteristic properties of BP obtained under optimum conditions were compared with whey protein. The characteristic bonds of the proteins were confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and molecular weights were determined by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-page). The solubility values of BP and whey protein were found to be as 80.23% and 91.12%, respectively ( $P < 0.05$ ). BP's foaming properties, emulsifying behavior, and stability coefficient resulted in superior to whey protein. The results showed plant proteins will be considered as alternative protein sources in food systems.

**Keywords:** Faba bean protein concentrate, whey protein, FTIR, molecular weight, emulsion

\* Sorumlu yazar /Corresponding author

✉: sukrukarakus@harran.edu.tr

☎: (+90) 414 318 1060

Mehmet Şükrü Karakuş; ORCID no: 0000-0002-1805-8206

## GİRİŞ

İnsan beslenmesinde ve gelişiminde önemli bir rol oynayan proteinler, bir makro besin maddesi olarak kabul edilmektedirler. Proteinler, sindirilebilirlik, biyoyararlanım, amino asit dizilimi, işleme ve saflık derecelerine göre değişim gösterebilmektedir (Kumar vd., 2022). Gıda sanayisinde kullanılan proteinler bitkisel ve hayvansal olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hayvansal proteinler kırmızı et, deniz ürünleri, yumurta, süt ve böcekler gibi kaynaklardan elde edilmektedir. Gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan hayvansal proteinler arasında jelatin, kazein ve peyniraltı suyu proteini bulunmaktadır. Süt endüstrisinin bir yan ürünü olan peyniraltı suyu proteini (PSP) (whey protein) sütteki toplam proteininin yaklaşık %20'sini (kazein hariç) oluşturmaktadır. Yüksek besin içeriği, iyileştirici yapısal özellikleri ve bol miktarda bulunmasından dolayı başta gıda sanayisi olmak üzere ilaç ve biyolojik materyallerin kullanımında yaygındır (Du vd., 2022). Ayrıca bitkisel proteinlerle karşılaştırıldığında PSP'nin jelleşme özelliği, emülsifiye edici davranışları ve köpük oluşturma gibi fonksiyonel özellikler açısından daha üstün olduğu bildirilmiştir (Kim vd., 2020). Buna karşın PSP'nin fiyatının yüksek olması, arzının sınırlı olması, yüksek enerji tüketimi, iklim değişikliği, sera gazı emülsiyonlarındaki yoğunluk, dünya nüfusundaki artış ve proteine ulaşmadaki zorluklar alternatif bitkisel proteinlere yönelimi popüler hale getirmiştir (Kumar vd., 2022). Başka bir ifadeyle geleneksel hayvansal protein kaynakları geniş arazi ve yoğun kaynak gerektirmektedir. İhtiyaç duyulan geniş alanlar nedeniyle ormansızlaşma ve arazi bozulması nedeniyle iklim üzerinde büyük bir değişiklik meydana gelebilmektedir. İklim değişikliğinin bir başka nedeni ise gübre kullanımına bağlı azot fosfor dengesinin (biyolojik çeşitlilik kaybı ve karbon döngüsünün bozulması) bozulmasıdır (Aiking, 2014). Öte yandan küresel sera gazı emisyonlarının yaklaşık %18'i hayvancılıktan kaynaklanmaktadır. Sera gazı emisyonlarının başlıcaları enterik fermantasyondan kaynaklanan metan (CH<sub>4</sub>), suni gübreden kaynaklanan azot oksit (N<sub>2</sub>O) ve tarımsal enerji kullanımından kaynaklanan karbondioksittir (CO<sub>2</sub>) (Stehfest vd., 2009). Çevresel etkileri yüksek gıdaların (özellikle

hayvansal ürünlerin) alternatifleri ile değiştirilmesi gıda sistemlerinin çevresel etkilerini azaltabilmektedir (Springmann vd., 2018). Bu bağlamda, bitki bazlı proteinler geniş ürün yelpazesi, yetiştirme kolaylığı ve daha düşük üretim maliyeti nedeniyle umut verici bir çözümü temsil etmektedir. Bitkisel protein kaynakları arasında baklagiller (soya, fasulye, bezelye, bakla, nohut, börülce), tahıl proteinleri (pirinç, buğday, arpa ve mısır) ve yalancı tahıllar (amaranth, kinoa, chia ve karabuğday) bulunmaktadır.

Bakla (*Vicia faba L.*) yüksek oranda vitamin, mineral ve diyet lif içerdiğinden dolayı Avrupa, Asya ve Afrika başta olmak üzere birçok ülkede besin maddesi olarak tüketilmektedir (Multari vd., 2015). Ayrıca bu besin maddesi çeşitliliğe ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak yüksek oranda (%27-34) protein içermektedir (Vioque vd., 2012). Bakla proteinin (BP) bileşimi baklagil benzeri globulinlerden (11S), vicilin benzeri globulinlerden (7S) ve albüminlerden (2S), glutelinden ve poliaminlerden oluşmaktadır (El Fiel vd., 2002). BP'nin lif oranı yüksek, alerjenitesi ve doymuş yağ oranı diğer bitkisel proteinlere göre daha düşüktür. Buna karşın bu proteinin fonksiyonel özelliklerinin (çözünürlük, su tutma, yağ bağlama vb.) hayvansal proteinlerden daha düşük olduğu bildirilmiştir (Hughes vd., 2011). Dolayısıyla BP gibi bitkisel proteinlerin düşük fonksiyonel davranışları gıda ürünlerinde kullanımlarını sınırlamaktadır. Örneğin düşük çözünürlük, bunların içeceklerle dahil edilmesini zorlaştırmaktadır. Başka bir ifadeyle kompakt, toplu ve esnek olmama eğilimleri, arayüzleri stabilize etme yeteneklerini sınırlandırmaktadır (McClements, 2007; Day vd., 2022). Bitkisel proteinlerin fizikokimyasal ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilerek gıda endüstrisinde kullanımı sağlanabilmektedir (Conde vd., 2005). Protein işlevselliği, proteinin tek başına veya diğer bileşenlerle kombinasyon halinde fiziksel, kimyasal ve/veya biyokimyasal işlemler uygulanarak geliştirilebilmektedir (Akharume vd., 2021). Isıtma, yüksek basınç uygulaması, mikrodalga ve ultrases uygulamaları ile proteinlerin işlevselliği iyileştirilebilmektedir (Balasubramaniam vd., 2015; Gharibzahedi ve Smith, 2020).

Mikrodalga işlemi, katı numunelerle temas halindeki polar çözücülerini (katı-sıvı) ısıtmak için mikrodalga enerjisinin termal etkilerini kullanan bir özütme işlemidir. Isınmanın neden olduğu sıcaklık ve basınç faktörlerindeki artış ile hücre duvarı tahrip olmaktadır. Bu şekilde hücre içindeki bileşenlerin çözücüye difüzyonu daha kolay olmaktadır (Kute vd., 2015). Kısa işlem süresi, düşük enerji gereksinimi, etkili hücre duvarı bozma yetisi ve kimyasal madde kullanımı gerektirmemesi bu işlemi avantajlı hale getirmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalar mikrodalga uygulamasının proteinlerin fonksiyonel özelliklerini geliştirdiği yönündedir (Vagadia vd., 2018; Varghese ve Pare, 2019).

Bu çalışmanın amacı, mikrodalga destekli özütme tekniğinin bakladan protein kazanımı ve elde edilen bu proteinin karakteristik özellikleri üzerindeki etkisini araştırmak ve bunu peyniraltı suyu proteini ile karşılaştırmaktır. Ayrıca, mikrodalga gücü ve işlem süresi parametrelerinin bakla protein verimi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Bu çalışmada kullanılan kuru bakla Şanlıurfa ilinde yer alan yerel bir pazardan, peyniraltı suyu tozu protein konsantresi (Whey Protein, %70) ise Kalipso Kimya (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma (St. Louis, MO, ABD) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından satın alınmıştır.

### Bakla proteini üretimi

#### *Alkali özütme*

Mikrodalga özütme tekniğinin protein verimi üzerindeki etkisini ortaya koymak amacıyla alkali özütme yöntemi ile protein verimleri karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, bir öğütücü (DMS253, Demisan, Türkiye) yardımıyla toz haline getirilen bakla numunesinden 10 g alınarak üzerine 100 mL 0.12 M NaOH eklenmiş ve 37 °C'lik çalkalayıcıda 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant toplanmıştır. Süpernatanttaki protein içeriği Lowry yöntemine göre belirlenmiştir

(Lowry vd., 1951). Lowry yöntemi, duyarlılık, doğrusallık ve geliştirilmiş metodolojisi nedeniyle, proteinden ve protein kökenli olmayan renk gelişimi arasında ayırım yapılmasını sağlayarak daha doğru bir kantitatif analiz sağlamasından dolayı tercih edilmiştir. Mevcut protein miktarı, sığır serum albümin (BSA) standardı kullanılarak hazırlanan bir kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır.

#### *Bakla proteininin mikrodalga destekli özütme optimizasyonu*

Bakla protein veriminde optimum koşulları belirlemek amacıyla Tepki-Yüzey Metodolojisi (RSM) kullanılmıştır. Merkezi tümlşik tasarımına göre 5 merkez nokta ve 8 eksenel nokta olmak üzere toplam 13 deneysel çalışma tasarlanmıştır. Bağımsız değişkenler mikrodalga gücü (250-500 W) ve işlem süresi (1-60 dakika) olarak seçilmiştir. Bağımlı değişken olarak protein verimi baz alınmıştır. Veriler, ikinci dereceden bir polinom modeli ve regrasyon katsayıları elde etmek için çoklu regrasyon sistemleri kullanılarak analiz edilmiştir (Çizelge 2). Deneysel tasarıma ilişkin veriler Çizelge 1'de sunulmuştur. Özütme, bir mikrodalga (SINEO II PLUS, Çin) sisteminde gerçekleştirilmiştir. Protein:distile su oranı 1:10 olacak şekilde, 250 mL'lik bir cam balon içerisinde hazırlanmıştır. Daha sonra, karışımların pH değeri 9.0'a ayarlanmıştır. Karışımlar, belirlenen optimizasyon şartlarında mikrodalga cihazı (mikrodalga gücü:250-500 W, özütme süresi: 10-60 dakika) haznesine yerleştirilmiştir. Süre sonunda karışımlar 4000 rpm'de 10 dakika (+4 °C) süreyle santrifüjlenmiştir (Nüve NF 1200R, Nüve, Türkiye). Süpernatant süzülerek toplanmış ve protein içeriği ölçüm testine tabi tutulmuştur. Protein içeriğini ölçmek için Lowry yöntemi kullanılmıştır (Lowry vd., 1951). Protein miktarı, sığır serum albümin (BSA) standardı kullanılarak hazırlanan bir kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır.

#### *Bakla proteini konsantrlerinin hazırlanması*

Optimizasyon sonucuna göre en yüksek protein içeriğine sahip deneme noktasında seri mikrodalga destekli özütme işlemleri uygulanmıştır. Bu bağlamda optimum mikrodalga gücü ve özütme süresine göre protein solüsyonları (protein: distile su 1:10) hazırlanmış toplanan süpernatantların pH değeri 4.5'e ayarlandıktan sonra protein

çökeltmesine tabi tutulmuşlardır. Bir gece buzdolabında bekletilen solüsyonlar 4000 rpm'de 10 dakika (+4 °C) süreyle santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmış ve protein peleti püskürtmeli kurutucu kullanılarak toz hale getirilmiştir.

#### **Püskürtmeli kurutma şartları**

Santrifüjden elde edilen çökelti saf su ile solüsyon haline getirilmiş ve pH değeri 9.0'a ayarlanarak bir püskürtmeli kurutucu (Unopex B15, Bak-On, Mak. Muh. Ltd. Sti., İzmir, Turkey) yardımıyla toz forma dönüştürülmüştür (Besleme hızı: 8 mL/dakika, Hava girişi sıcaklığı: 140 °C). Elde edilen protein tozu konsantreleri analizlerde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Başyigit vd., 2021).

#### **Analizler**

##### *FTIR spektroskopisi*

Optimum noktada elde edilen bakla proteini ve peyniraltı suyu protein konsantrelerinin karakteristik bantları FTIR cihazı (Shimadzu, Japonya) kullanılarak (dalga boyu: 500-4000 cm<sup>-1</sup>, tarama süresi: 32 s ve çözünürlük: 4 cm<sup>-1</sup>) belirlenmiştir (Lei vd., 2018).

##### *Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS)*

Bakla ve peyniraltı suyu protein konsantreleri (10 mg/mL) tamponda (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl ve %10'luk SDS) çözündürülmüştür (Ata vd., 2022). Hazırlanan örnekler yükleme tamponu (%5 Tris-HCl (pH 6.8), %4 gliserol, %0.8 SDS, %0.02 bromfenol mavisi ve %2 β-merkaptoetanol) ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılmıştır. SDS-PAGE analizi, %12 ayırma jeli ve %5 istifleme jeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Laemmli, 1970). Numuneler, jel şeritlerine yerleştirilmeden önce 10 dakika, 95 °C'de su banyosunda tutulmuştur. Moleküler ağırlık belirteci olarak ise standart bir protein karışımı (11-190 kDa) kullanılmıştır.

##### *Fizikokimyasal analizler*

##### *Protein içeriği*

Bakla proteininin protein içeriği, organik elementer analiz cihazı (FlashSmart Elemental, ThermoFisher Scientific, ABD) ile belirlenmiştir. Cihaz koşulları; CHNS reaktör sıcaklığı: 950 °C,

GC fırın sıcaklığı 65 °C, helyum taşıyıcı gaz akış hızı: 140 mL/dakika, helyum referans akışı: 100 mL/dakika, oksijen akış hızı 250 mL/dakika, oksijen enjeksiyon süresi: 5 dakika, örnek gecikme süresi: 12 s olarak tanımlanmıştır. Protein içeriği 6.25 (Nx6.25) dönüşüm faktörü ile hesaplanmıştır (Başyigit vd., 2021).

#### **Çözünürlük**

Proteinlerin çözünürlüğü daha önceki bir çalışmaya göre gerçekleştirilmiştir (Xia vd., 2023). Bu bağlamda 0.25 gram protein örneği 100 mL distile su içerisinde çözündürülmüş ve pH değeri 9.00'a ayarlanmıştır. Bir saat karıştırıldıktan sonra, nihai çözelti 3000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatanttaki protein içeriğini tespit etmek için Lowry metodu kullanılmıştır. Çözünürlük değeri Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Çözünürlük (\%)} = \frac{\text{Süpernatanttaki protein miktarı}}{\text{Örnekteki protein miktarı}} * 100 \quad (1)$$

#### **Su aktivitesi ve nem içeriği**

Su aktivitesi değeri, bir su aktivitesi ölçer (Aqualab, ABD) kullanılarak tespit edilmiştir. Nem içeriği gravimetrik yöntemle belirlenmiştir (AOAC, 2005).

#### **Renk**

Renk parametrelerinin ( $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$ ) belirlenmesinde renk ölçer (Color Quest, Hunter Associates Laboratory, Inc., ABD) kullanılmıştır (Duangmal vd., 2008).

#### **Fonksiyonel özellikler**

##### *Su tutma ve yağ bağlama kapasitesi*

Proteinlerin su tutma kapasitesi (STK) ve yağ bağlama kapasitesi (YBK) referans bir çalışma baz alınarak tespit edilmiştir (Cho vd., 2004). Bu amaçla, santrifüj tüplerine tartılan 1 g protein tozu STK için 20 mL distile su, YBK için ise 20 mL mısır yağı ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında tutulan karışımlar, her 15 dakika bir 5 s süreyle vortekslenmiştir. Bir saatlik inkübasyon süresinden sonra protein çözeltileri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj tüpü 30 dakika boyunca 45 °C'lik bir açıyla tutularak üst faz uzaklaştırılmış ve son ağırlık kaydedilmiştir.

STK ve YBK değerleri, son tartılan ağırlığın ilk tartılan ağırlığa bölünmesi ile hesaplanmıştır (Cho vd., 2004).

#### *Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi*

Köpük oluşturma kapasitesi için protein çözeltileri (%1, pH 7.0) distile su ile hazırlanmış ve protein tozlarının tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Çözündürme işleminden sonra 100 mL'lik dereceli silindire aktarılan karışımın ilk hacmi kaydedilmiştir. Ultra Turrax homojenizatör yardımıyla 12.000 rpm'de 1 dakika karıştırma sonunda oluşan hacim not edilmiştir. Köpük oluşturma stabilitesi için 10. ve 30. dakika hacimleri kaydedilmiştir. Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesinin hesaplanmasında aşağıda verilen Eşitlik 2. ve 3. Kullanılmıştır (Li vd., 2021).

$$\text{Köpük oluşturma kapasitesi (\%)} = \frac{V_a - V_b}{V_b} * 100 \quad (2)$$

$$\text{Köpük oluşturma stabilitesi (\%)} = \frac{V_t}{V_a} * 100 \quad (3)$$

$V_a$ = Homojenizasyon sonrası solüsyonun hacmi,  
 $V_b$ = Solüsyonun ilk hacmi,  $V_t$ = Homojenizasyon sonrası 10. ve 30. dakikadaki hacim

#### *Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi*

Protein tozları (%0.5 w/v) 100 mL (10 mM) potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ile karıştırıldıktan sonra bu karışıma 1:3 (v/v) oranında mısır yağı ilave edilmiştir. Emülsiyon hazırlamak için, bu karışım 12.000 rpm'de 1 dakika boyunca Ultra-Turrax kullanılarak (IKA-T18 Basic, Japonya) homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu emülsiyonlar (50 µL) ile 5 mL %0.1 (w/v) sodyum dodesil sülfat bir cam tüp içerisinde karıştırılmıştır. Emülsiyon aktivitesini (EAI) tespit etmek için karışımın absorbansı bir UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 500 nm dalga boyunda okunmuştur. Emülsiyon stabilite indeksi (ESI) ölçümü 10. ve 30. dakika absorbans değerlerinin kaydedilmesiyle belirlenmiştir. EAI ve ESI değerleri aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 4 ve 5).

$$\text{Emülsiyon aktivitesi (m}^2/\text{g)} = \frac{2 * 2.303 * A_i * SF}{C * \varphi * \theta * 1000} \quad (4)$$

$$\text{Emülsiyon stabilitesi (dakika)} = \frac{A_i}{A_i - A_t} * t \quad (5)$$

$A_i$ = Homojenizasyon işleminden sonra ölçülen absorbans değerleri;  $SF$ = Seyreltme faktörü;  $C$ = Protein konsantrasyonu (5 mg/mL);  $\varphi$ = Optik yol;  $\theta$ = Yağ hacim fraksiyonu;  $A_t$ = Homojenizasyon işleminden 10 dakika sonra ölçülen absorbans değerleri (Lee vd., 2021).

#### *Stabilite indeksi*

Stabilite indeksi değeri için, 15 mL'lik santrifüj tüpüne taze hazırlanan emülsiyonlar (10 mL) eklenerek 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası emülsiyonların görüntüleri dikkate alınarak alt (emülsiyon) ve üst (krem) fazların hacimsel olarak kapladıkları oranlar stabilite indeksi değeri olarak yorumlanmıştır (Wang vd., 2016).

#### *Stabilite katsayısı*

Taze hazırlanan emülsiyondan 10 mL alınarak 2000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonunda elde edilen süpernatantın 100 kat seyreltilmiş hali ile seyreltilmemiş (orijinal) hali UV-VIS spektrofotometre kullanılarak 750 nm'de okunmuştur. Absorbans değerleri aşağıda yer alan Eşitlik 6.'daki ilgili yerlere yerleştirilerek stabilite katsayısı hesaplanmıştır (Li vd., 2019).

$$\text{Stabilite katsayısı} = \frac{A_2}{A_1} \quad (6)$$

$A_1$ : Orijinal örneğe ait absorbans değeri;  $A_2$ : Seyreltilmiş örneğe ait absorbans değeri

#### **Santrifüj çökme oranı**

On mL taze emülsiyon 2500 rpm'de 40 dakika süre ile santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve içerisinde tortu (çökelti) bulunan santrifüj tüplerinin ağız aşağı gelecek şekilde 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Süre sonunda Eşitlik 7. kullanılarak santrifüj çökme oranı tespit edilmiştir (Li vd., 2019).

$$\text{Santrifüj çökme oranı} = \frac{m_2}{m_1} * 100 \quad (7)$$

$m_1$ : Başlangıç emülsiyon ağırlığı (10 mL);  $m_2$ : tortu (çökelti) ağırlığı

#### **İstatistiksel analizler**

Çalışmalar 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. SPSS paket programı (SPSS Inc., Şikago, IL, ABD) kullanılarak ortalamalar arasındaki

istatistiksel farklılıklar değerlendirilmiş ve t testi  $P < 0.05$  istatistiki önem düzeyinde belirlenmiştir. Şekillerin çiziminde OriginPro 8 (Origin Lab Inc., Northampton, ABD) programı kullanılmıştır. Ayrıca bakla proteininin optimizasyonunda Design-Expert ((Stat Ease, Design Expert 7.0, ABD) programından yararlanılmıştır.

## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### Optimizasyon işlemi

BP üretiminde mikrodalga destekli özütleme işlemi uygulanmıştır. Mikrodalga destekli özütleme işlemlerinin deneysel tasarımında mikrodalga gücü ve proses süresi bağımsız değişkenler olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 1, mikrodalga destekli özütlemenin deneysel tasarımını ve beş tanesi merkez nokta olmak üzere 13 deneme ile yürütülen protein verimi sonuçlarını göstermektedir. Protein verimi oranları %32.96-54.55 aralığında tespit edilmiştir. Regresyon modelleri için ikinci dereceden model katsayıları ve ANOVA sonuçları Çizelge 2'de verilmiştir. Optimum koşulların belirlenmesinde belirleme katsayısı ( $R^2$ ), ayarlanmış  $R^2$ , uyum eksikliği (lack of fit) ve  $P$  değerleri dikkate alınmıştır. Belirleme katsayısı ( $R^2$ ) 0.97 ve

ayarlanmış  $R^2$  değeri 0.94 olarak tespit edilmiş ve bu da modellerin uyumluluğu açısından önem arz etmektedir. Ayrıca uyum eksikliği değerinin anlamlı olmaması ( $P > 0.05$ ) model belirlemede göz önünde bulundurulacak bir başka önemli parametredir. Mikrodalga gücünün ( $P < 0.01$ ) ve proses süresinin ( $P < 0.05$ ) protein verimi üzerinde etkileri önemli bulunmuştur. Mikrodalga gücü ve süresi arttıkça özütlerin protein veriminde de artış gözlenmiştir. Mikrodalga uygulaması, reaksiyona giren bileşikler üzerinde termal etkileşimlere neden olabilmektedir. Bu uygulama biyokütlelerin bir elektromanyetik dalganın elektrik alan bileşeni ile etkileşimine yol açacaktır. Sonuçta, hücre duvarlarına basınç uygulayan suyun buharlaşmasına bağlı hücre yapısı bozulmaktadır (Kapoor vd., 2018). Böylelikle hücre duvarından hedeflenen bileşiklerin ortam çözücüsüne geçişi daha kolay olmaktadır. Literatür çalışmalarında bu durumun protein verimi üzerinde artış sağladığı bildirilmiştir (Görgüç vd., 2020). Yapılan optimizasyon işlemi sonunda 481.70 W mikrodalga gücü ve 50.68 proses süresinde protein veriminin %47.74 olabileceği tahmin edilmiştir.

Çizelge 1. Mikrodalga destekli özütleme koşullarına ait deneysel parametreler

Table 1. Experimental parameters of microwave-assisted extraction conditions

Parametreler <i>Parameters</i>	Bağımsız değişkenler <i>Independent variables</i>		Bağımlı değişken <i>Dependent variable</i>
	Mikrodalga gücü (W) <i>Microwave power (W)</i>	İşlem süresi (dakika) <i>Processing time (min)</i>	Protein verimi (%) <i>Protein yield (%)</i>
1	250.00	60.00	38.53
2	375.00	35.00	54.55
3	375.00	35.00	51.78
4	375.00	10.00	40.56
5	375.00	35.00	53.41
6	500.00	60.00	42.90
7	250.00	10.00	32.96
8	250.00	35.00	42.63
9	500.00	35.00	46.94
10	500.00	10.00	40.48
11	375.00	35.00	51.93
12	375.00	60.00	44.37
13	375.00	35.00	52.48
Optimum nokta <i>Optimum point</i>	481.70	50.68	47.74
Alkali özütleme <i>Alkaline extraction</i>			31.25

Çizelge 2. Mikrodalga destekli özütlenme koşullarına ait ANOVA sonuçları  
Table 2. ANOVA results of microwave-assisted extraction conditions

Katsayı/Değer Coefficient/value	Verim (%) Yield (%)
$\beta_0$	52.24
<i>Kuadratik (Quadratic)</i>	
$\beta_1$ (Güç) (Power)	2.70**
$\beta_2$ (Süre) (Time)	1.97*
<i>Etkileşimli (Interaction)</i>	
$\beta_{12}$ (Güç x süre) (Power x time)	-0.79
<i>İkinci derece (Second order)</i>	
$\beta_{11}$ (Güç) <sup>2</sup> (Power)	-5.97***
$\beta_{22}$ (Süre) <sup>2</sup> (Time)	-8.29***
<i>Regresyon katsayıları (Regression coefficients)</i>	
R <sup>2</sup>	0.97
Ayarlanmış R <sup>2</sup> (Adjusted R <sup>2</sup> )	0.94
p-değeri (p-value)	<0.0001
Uyum eksikliği (Lack of fit)	0.13

Model: Protein verimi =  $\beta_0 + \beta_1$  (Güç) +  $\beta_2$  (Süre) +  $\beta_{12}$  (Güç × Süre) +  $\beta_{11}$  (Güç × Güç) +  $\beta_{22}$  (Süre × Süre). İstatistik önem dereceleri: \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001

Model: Protein yield =  $\beta_0 + \beta_1$  (Güç) +  $\beta_2$  (Süre) +  $\beta_{12}$  (Güç × Süre) +  $\beta_{11}$  (Güç × Güç) +  $\beta_{22}$  (Süre × Süre).

Statistical significance levels: \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001

## FTIR

FTIR, maddelerin kimyasal bileşimini kızılötesi absorpsiyon modellerine göre analiz etmek için kullanılan bir tekniktir. Bitki ve hayvan proteinleri söz konusu olduğunda, FTIR bunların yapısal özellikleri ve fonksiyonel grupları hakkında bilgi sağlamaktadır. Bitki proteinleri tipik olarak amidler, karboniller ve hidroksiller gibi ortak fonksiyonel grupların varlığıyla ilgili spesifik absorpsiyon bantları sergilemektedir. Bu bantlar, proteinin ikincil yapısı hakkında bilgi vermektedir. Bakla ve peyniraltı suyu proteinlerine ait FTIR spektrumları Şekil 1a'da gösterilmiştir. BP ve PSP'ye özgü parmak izi bölgeleri amid III (1239-1233), amid II (1539-1523), amid I (1642-1637 cm<sup>-1</sup>), amid B (2930-2925) ve amid A (3281-3276) olarak tespit edilmiştir. Belirlenen pik bölgeleri literatürde bildirilen dalga boyu aralıklarıyla da uyumludur (Quanhong ve Caili, 2005; Haris, 2013). Amid I ve amid II bantları proteinlere özgü ikincil yapılarının tayininde önemlidir. Bu bantlardan amid I bandı peptit bağlarının C=O gerilme titreşimlerini gösterirken amid II bandı N-H ve C-H germe titreşimleri sonucu meydana gelmektedir (Haris, 2013). Ayrıca amid III bandı C-N, amid A N-H, amid B ise =CH ve -NH<sub>3</sub> titreşimleri sonucu oluşmaktadır (Grdadolnik,

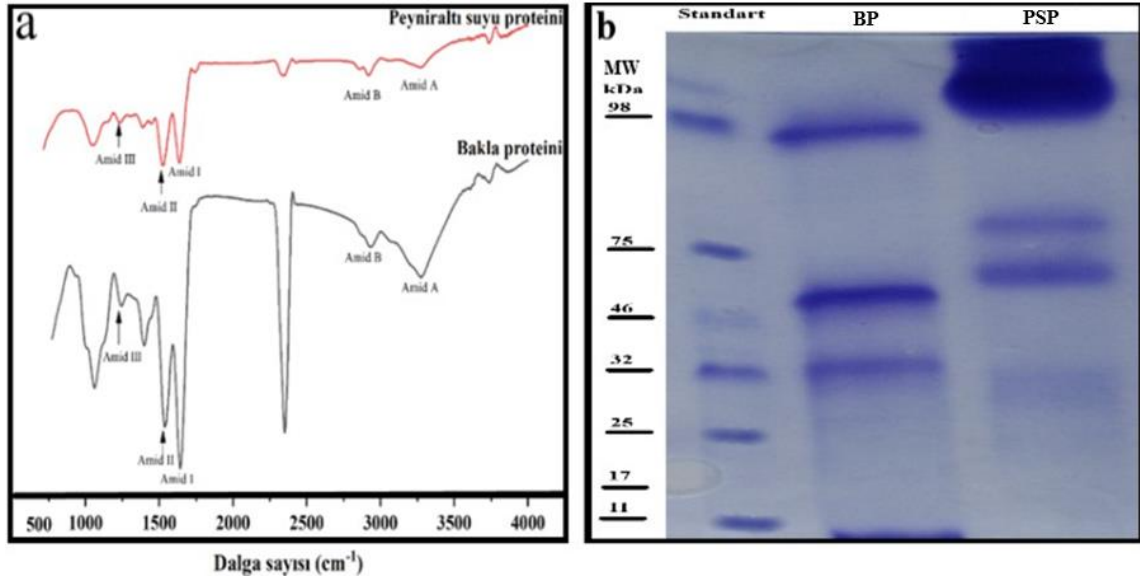
2003). Çalışmada elde edilen FTIR spektrumları proteinlerin yapısını doğrulamıştır.

## SDS-PAGE

SDS-PAGE, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması ve analizi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Proteinlerin moleküler ağırlığını belirlemek, protein saflığını değerlendirmek ve protein-protein etkileşimlerini analiz etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada BP ve PSP'nin SDS görüntüleri Şekil 1b'de sunulmuştur. Bakla proteininin alt birimleri 7S ve 11S globulinlerinin olduğu bildirilmiştir (Cai vd., 2002). BP'nin moleküler ağırlıkları 11-98 kDa arasında tespit edilmiş ve BP 46 kDa'da yoğun bir bant sergilemiştir. BP'de 11 kDa ve 25-32 kDa aralığındaki bantlar 11S fraksiyonun (baklagil) asidik ve bazik alt birimlerine karşılık gelmektedir (Kosińska vd., 2011). Moleküler ağırlığı 46 kDa'luk yoğun bant, vicilin benzeri (7S) fraksiyonun alt birimlerini ifade etmektedir (Alu'datt vd., 2017). PSP'nin moleküler ağırlıkları ise 32-98 kDa aralığında belirlenmiş ve 98 kDa yoğun bir bant görülmüştür. PSP'deki 32 kDa, 75 kDa ve 98 kDa moleküler ağırlığına sahip bantlar sırasıyla kazein, serum albümin ve immunoglobulini (BSA) temsil etmektedir. Buna karşın PSP'ye özgü  $\alpha$ -



laktalbumin (14 kDa) ve  $\beta$ -laktoglobulin (21 kDa) tespit edilememiştir.



Şekil 1. Bakla ve peyniraltı suyu proteinlerinin FTIR spektrum (a), SDS-PAGE görüntüsü (b)  
Figure 1. FTIR spectrum (a), SDS-PAGE pattern of faba bean and whey proteins (b)

### Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri

Protein konsantrasyonlarının fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3'te sunulmuştur. BP ve PSP'nin nem miktarı ve su aktivitesi değerleri incelendiğinde BP'nin bu değerleri daha düşük bulunmuştur. Proteinlerin renk değerlerine bakıldığında ise PSP'nin  $L^*$  değerinin BP'den daha yüksek olduğu ve renginin daha parlak olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşın BP'nin  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerinin ise PSP'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç baklaların renginden sorumlu tanenlere (proantosiyanidinler) bağlanabilir (Sharan vd., 2021). BP ve PSP'nin protein verimi değerleri sırasıyla %67.13 ve %70.00 olarak tespit edilmiştir. Mikrodalga destekli enzimatik özütleme yöntemiyle susam kepeğinden proteininin elde edildiği çalışmada protein veriminde artış olduğu bildirilmiştir (Görgüç vd., 2019). Çözünürlük, fonksiyonel özellikleri ve uygulama potansiyelini yansıtabilen protein denatürasyon agregasyonunun önemli bir kriteridir. Yapılan çalışmada PSP'nin çözünürlük değeri (%91.12) BP'den (%80.23) daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak, proteinlerin iyi emülsiyon, köpük, jelleşme özelliklerini sağlayabilmeleri için yüksek çözünürlüğe sahip

olmaları gerekmektedir. Proteinlerin çözünürlüğü, yüzey hidrofobik (protein-protein) ve hidrofilik (protein-çözücü) etkileşimi ile ilgili bir durumdur. Proteinler suda çözünebilen hidrofilik karakter sergilemektedirler (Pelegri ve Gasparetto, 2005). Benzer bulgular önceki çalışmalarda da rapor edilmiştir. Bezelye proteinlerinin pH 8.5'da en yüksek çözünürlük değeri ~%87 olarak tespit edilmiştir (Gao vd., 2020). Yapılan başka bir çalışmada ise bakla protein izolatlarının çözünürlük değerleri (%43-90) ultrason destekli alkali işleme geliştirilmiştir (Alavi vd., 2021). Örneklerin carr indeksi ve hausner oranı Çizelge 3'te sunulmuştur. Düşük carr indeksi değerine (20-35) sahip tozların iyi akış özelliği sergilediği ve yüksek hausner oranına (>1.25) sahip tozların ise daha yapışkan özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. BP ve PSP'nin carr indeksi değerleri 44.12 ve 39.65, hausner oranları ise 1.37 ve 1.24 olarak belirlenmiştir. Carr indeksi ve hausner oranlarına göre protein tozlarının zayıf akışkan özellikte olduğu sonucuna varılmıştır. Tozların yapışkanlık ve akışkanlık özelliklerinin partikül şekli, yüzey, boyut, higroskopik ve gözenek yapısına göre belirlendiği bildirilmiştir (Sharma vd., 2012).

Çizelge 3. Protein konsantrlerinin fizikokimyasal özellikleri  
 Table 3. Physicochemical properties of protein concentrates

Analizler <i>Analyses</i>	Bakla proteini <i>Faba bean protein</i>	Peyniraltı suyu proteini <i>Whey protein</i>
Protein verimi ( <i>Protein yield</i> ) (%)	67.13±0.26 <sup>b</sup>	70.00±0.00 <sup>a</sup>
Çözünürlük (pH:9.0) ( <i>Solubility</i> ) (%)	80.23±0.19 <sup>b</sup>	91.12±0.05 <sup>a</sup>
Nem miktarı ( <i>Moisture content</i> ) (%)	4.12±0.08 <sup>b</sup>	6.02±0.11 <sup>a</sup>
Su aktivitesi ( <i>Water activity</i> )	0.274±0.01 <sup>b</sup>	0.328±0.02 <sup>a</sup>
Renk ( <i>Color</i> ) L*	72.60±0.25 <sup>b</sup>	90.68±0.07 <sup>a</sup>
a*	2.40±0.14 <sup>a</sup>	0.80±0.01 <sup>b</sup>
b*	15.41±0.06 <sup>a</sup>	12.99±0.06 <sup>b</sup>
Carr indeksi ( <i>Carr index</i> )	44.12±0.4 <sup>a</sup>	39.65±0.19 <sup>b</sup>
Hausner oranı ( <i>Hausner ratio</i> )	1.37±0.09 <sup>a</sup>	1.24±0.12 <sup>b</sup>

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı satırda yer alan küçük harfler (a-b) ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $P < 0.05$ )

Results are given as mean ± standard deviation from triplicate (n=3). Lowercase letters (a-b) on the same line represent the statistical difference between the means ( $P < 0.05$ ).

#### Proteinlerin fonksiyonel özellikleri

Protein konsantrlerinin su tutma, yağ bağlama kapasiteleri, köpük oluşturma kapasiteleri ve

stabilite, emülsiyon aktiviteleri ve stabilite Çizelge 4’te verilmiştir.

Çizelge 4. Protein konsantrlerinin fonksiyonel özellikleri  
 Table 4. Functional properties of protein concentrates

Analizler <i>Analyses</i>	Bakla proteini <i>Faba bean protein</i>	Peyniraltı suyu proteini <i>Whey protein</i>
Su tutma kapasitesi ( <i>Water holding capacity</i> ) (%)	315.56±0.32	-
Yağ bağlama kapasitesi ( <i>Oil binding capacity</i> ) (%)	392.23±0.11 <sup>a</sup>	350.12±0.23 <sup>b</sup>
Köpük oluşturma kapasitesi ( <i>Foaming capacity</i> ) (%)	74.10±0.11 <sup>a</sup>	32.05±0.02 <sup>b</sup>
Köpük stabilitesi (10 dakika) ( <i>Foaming stability</i> ) (10 <sup>th</sup> min)	94.59±0.33 <sup>a</sup>	50.00±0.09 <sup>b</sup>
Köpük stabilitesi (30 dakika) ( <i>Foaming stability</i> ) (30 <sup>th</sup> min)	81.08±0.12 <sup>a</sup>	12.50±0.11 <sup>b</sup>
Emülsiyon aktivite indeksi ( <i>Emulsifying activity index</i> ) ( $m^2/g$ )	55.86±0.13 <sup>a</sup>	36.81±0.06 <sup>b</sup>
Emülsiyon stabilite indeksi (dakika) ( <i>Emulsifying stability index</i> ) (ESI10) (min)	38.09±0.19 <sup>a</sup>	22.45±0.21 <sup>b</sup>

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama ±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı satırda yer alan küçük harfler (a-b) ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $P < 0.05$ )

Results are given as mean ± standard deviation from triplicate (n=3). Lowercase letters (a-b) on the same line represent the statistical difference between the means ( $P < 0.05$ ).

Su tutma (STK) ve yağ bağlama kapasiteleri (YBK), proteinlerin su/yağ tutma özelliğini ve protein su/yağ etkileşimlerini belirlemektedir. Bunlar proteinlerin çözünürlük, emülsifiye etme

ve jelleşme gibi fonksiyonel özellikleri etkileyebilmektedir (Shen ve Li, 2021). Bu çalışmada BP’nin STK değeri %315.56, PSP’nin bu değeri ise çözüldüğünden dolayı tespit

edilememiştir. Bu durum peyniraltı suyu proteinin yüksek çözünürlüğüne atfedilmiştir (Day vd., 2022). Ayrıca, mikrodalga uygulaması ile protein denatürasyonuna bağlı yüksek sayıda hidrofilik amino asidin etkilenmesi sonucunda STK değeri iyileştirilmektedir (Ochova-Rivas vd., 2017). Bu çalışmada elde edilen STK değerleri Das vd., (2023) tarafından bildirilen değerlerle tutarlıdır (Das vd., 2023). Mikrodalga uygulaması ile soya protein izolatlarının STK değerleri %383.94'ten %582.96'ya yükseltilmiştir (Das vd., 2023). YBK değerleri ise %392.23 (BP) ve %350.12 (PSP) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4). BP'nin YBK değeri PSP'den daha yüksek bulunmuştur. Bakla proteini için benzer sonuçlar önceki çalışmada da bildirilmiştir (de Paiva Gouvêa vd., 2023). Diğer yandan peyniraltı suyu proteini üzerine yapılan bir çalışmada ise STK değeri belirlenememiş buna karşın YBK değeri %159 olarak rapor edilmiştir (Aydemir ve Yemenicioğlu, 2013). Yapılan başka bir çalışmada ise bezelye ve ticari peyniraltı suyu proteinleri karşılaştırılmış ve STK değerleri %250 (bezelye) ve %0.00 (peyniraltı suyu), YBK değerleri ise %370 (bezelye) ve %190 (peyniraltı suyu) olarak bildirilmiştir (Stone vd., 2015; Lam vd., 2017). Bakla proteinleri suda çözünür albüminler ve tuzda çözünür globülinler içerdiğinden dolayı STK değişiklik gösterebilmektedir. Bunlara karşın YBK değerindeki değişiklikler ise proteinlerin hidrofobikliğine bağlanmıştır (Day vd., 2022).

Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi proteinlerin fonksiyonel özelliklerinin karakterizasyonunda önem arz eden kriterlerdir. Proteinler köpürme özelliklerinden dolayı birçok uygulamada yüzey aktif maddeler olarak işlev görmektedirler (Cano-Medina vd., 2011). BP ve PSP örneklerine ait köpük oluşturma kapasite (KOK) ve stabilite (KOS) değerleri Çizelge 4'te sunulmuştur. BP'nin PSP'den daha yüksek KOK ve KOS değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Proteinlerin köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi değerlerinin belirlenmesinde çözünürlük, yüzey yükü, yüzey hidrofobikliği ve moleküler esneklik gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmiştir (Damodaran, 2006). Köpük kapasitesi ve stabilitesinde önemli bir kriter olan yüzey yükünün etkisi, pH, iyonik ortam ve

moleküller arası protein etkileşimlerine bağlanmıştır (Gochev vd., 2014). Öte yandan, mikrodalga uygulaması ile proteinlerin açılması ve yeniden düzenlenmesine bağlı olarak, hava-su arayüzlerinde absorpsiyon yeteneklerindeki artıştan dolayı köpük oluşturma özellikleri iyileştirilebilmektedir (Phuangjit vd., 2024). Literatürde de benzer sonuçlar bildirilmiştir. Bakla proteini üzerine yapılan bir çalışmada köpük kapasitesi ve stabilitesi değerleri sırasıyla %67 ve %89 olarak rapor edilmiştir (Martínez-Velasco vd., 2018). Yapılan başka bir çalışmada ise mikrodalga işlemine tabi tutulan soya protein izolatlarının köpük oluşturma kapasiteleri %26.67'den %36'ya çıkarılmıştır. (Das vd., 2023). Ayrıca herhangi bir işlem uygulanmayan peyniraltı suyu proteinin köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi sırasıyla %60 ve %70 olarak tespit edilmiştir (Zhao vd., 2022).

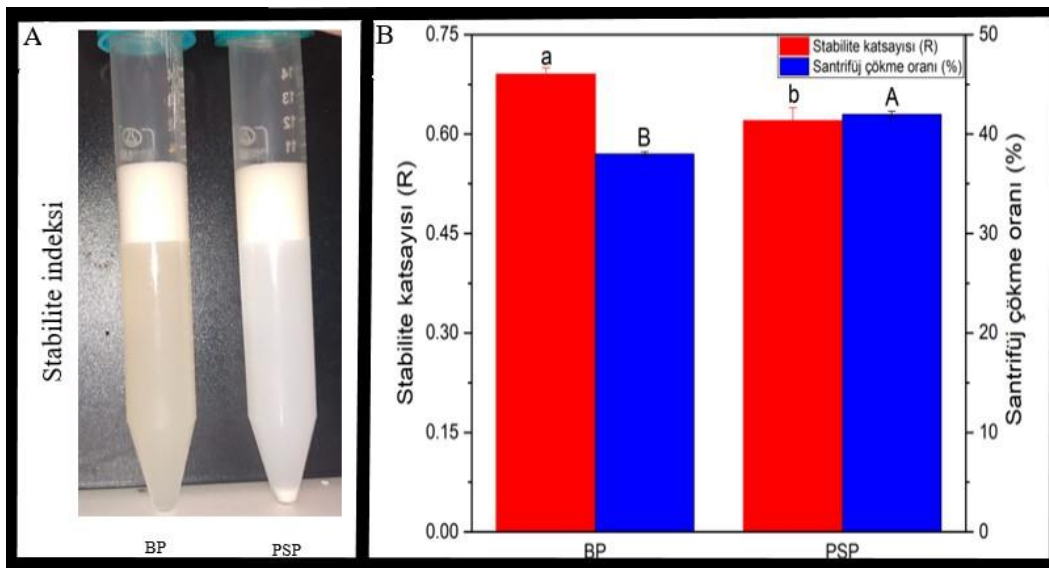
Emülsiyon aktivitesi (EAI) ve stabilitesi (ESI), gıda proteinlerinin emülsifiye edici özelliklerini değerlendirmek için kullanılan iki önemli parametredir (Boye vd., 2010). Yapılan çalışmada BP ve PSP'nin EAI değerleri 55.86 ve 36.81 m<sup>2</sup>/g, ESI değerleri ise 38.09 ve 22.45 dakika olarak belirlenmiştir (Çizelge 4). BP konsantrasyonunun EAI ve ESI değerleri PSP'den daha yüksek bulunmuştur. Bakla üzerine yapılan bir çalışma EAI ve ESI değerleri sırasıyla %44.29 ve 69.39 dakika olarak bildirilmiştir (Karaca vd., 2011). Bitki globulin proteinleri doğal olarak yüksek moleküler ağırlıklı trimerler (7S vicilinler) veya heksamerler (11S baklagiller) halinde olduğundan dolayı emülsiyon özellikleri değişebilmektedir (Boye vd., 2010). Ayrıca, bir emülsiyonun oluşma mekanizmasının birleşme, topaklanma ve Ostwald olgunlaşması arayüzünün özelliklerinden (yük, kalınlık, geçirgenlik ve sterik bariyer) kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Day vd., 2022).

#### **Proteinlerin Stabilite indeksi, stabilite katsayısı ve santrifüj çökme oranı**

Bakla ve peyniraltı suyu proteinleri kullanılarak oluşturulan emülsiyonlara ait stabilite indeksleri Şekil 2A'da sunulmuştur. Bu değerlerin yorumlanmasında emülsiyonların santrifüjleme sonrası görüntülerinden yararlanılmıştır. Her iki

örnekte de yukarıdan aşağıya doğru krem ve emülsiyon olmak üzere iki farklı faz belirlenmiştir (Şekil 2A). BP ve PSP'de yağ fazı ayrımı gözlemlenmemiştir. Bu durumun proteinlerin yüzey aktif madde özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer yandan emülsiyonların kararlılığını belirleyen ve aralarında negatif bir ilişki bulunan stabilite katsayısı (R) ve santrifüj çökme oranı (CPR) değerleri Şekil 2B'de verilmiştir. BP'nin R değeri (0.69) PSP'den (0.62) daha yüksek bulunmuştur. Buna karşın PSP'nin CPR değerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

CPR değeri düşük, R değeri yüksek olduğunda emülsiyonlar daha kararlıdır. Ek olarak R değeri 1'e yaklaştıkça emülsiyonların kararlılığı daha yüksek olmaktadır. Kolza proteini üzerine yapılan çalışmada R ve CPR değerleri sırasıyla 0.40 ve %43 olarak tespit edilmiştir (Li vd., 2019). Ultrases destekli özütleme ile elde edilen nohut proteinlerinin R ve CPR değerleri sırasıyla 0.68 ve %14.60 olarak bildirilmiştir (Akalan vd., 2023). Vişne çekirdeği protein izolatları (SCPI) üzerine yapılan çalışmada R ve CPR değerleri sırasıyla 0.60 ve %59.17 olarak bildirilmiştir (Akalan vd., 2024).



Şekil 2. Proteinlerin Stabilite indeksi, stabilite katsayısı ve santrifüj çökme oranı

Figure 2. Stability index, stability coefficient, and centrifugal precipitation rate of proteins

Sonuçlar üç tekrarlı (n=3) ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Küçük harfler (a-b) stabilite katsayılarının, büyük harfler (A-B) santrifüj çökme oranlarının ortalamaları arasındaki istatistiksel farklılığı temsil etmektedir ( $P < 0.05$ ).

Results are given as mean  $\pm$  standard deviation from triplicate (n=3). Lowercase letters (a-b) represent the statistical difference between the averages of stability coefficients and uppercase letters (A-B) represent the averages of centrifugal precipitation rates ( $P < 0.05$ ).

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda sistemlerinde emülsiyon ve köpük oluşturmada hayvansal proteinlerin önemi yadsınamayacak düzeydedir. Buna karşın protein talebindeki küresel artışa bağlı olarak, gıda endüstrisinde bitkisel proteinlerin önemi gün geçtikçe popüler hale gelmektedir. Birçok çalışma, bu bitki bazlı proteinlerin hayvansal proteinlerle kıyaslandığında daha düşük işlevselliğe sahip olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda, bitkisel proteinlerin fonksiyonel özelliklerini ortaya koymak, farklı işleme teknolojileriyle işlevselliğini

arttırmak mümkündür. Hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilen proteinlerin teknolojik işlevselliğinin karşılaştırılması nadir görülen standartlaştırılmış analitik yöntemlerin kullanımına dayanmaktadır. Bu çalışma gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan peyniraltı suyu proteini ile bitkisel kaynaklı bakla proteininin fizikokimyasal, fonksiyonel ve karakteristik özelliklerini karşılaştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışma sonuçları bakla proteininin peyniraltı suyuna kıyasla, köpük oluşturma ve emülsiyonlarda daha kararlı bir yapı sergilediğini

göstermiştir. Bu bağlamda yenilikçi gıda işleme teknikleriyle bitkisel proteinlerin fizikokimyasal yapıları geliştirilerek alternatif protein kaynakları çeşitlendirilebilir.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazar bu çalışmada, kişiler/kurumlar arasında bir çıkar çatışmasını bulunmadığını beyan eder.

### KAYNAKLAR

Aiking, H. (2014). Protein production: planet, profit, plus people?. *The American journal of clinical nutrition*, 100: 483S-489S, doi.org/10.3945/ajcn.113.071209.

Akalan, M., Karakuş, M. Ş., Başıyigit, B., Karaaslan, A., Karaaslan, M. (2023). Nohut proteini: Ultrases destekli özütlemenin optimizasyonu ve tekno-fonksiyonel davranışları. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 12(4): 1296-1304, doi.org/10.28948/ngumuh.1296312.

Akalan, M., Başıyigit, B., Yücepete, M., Karakuş, M. Ş., Bayrak Akay, K., Karaaslan, A., Karaaslan, M. (2024). Sour cherry seed proteins devoted to covalently bonded carbohydrate moieties: efficacy of transaction and carbohydrate type on amino acid distribution and emulsifier behavior. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-15, doi.org/10.1007/s11694-023-02347-z.

Akharume, F. U., Aluko, R. E., Adedeji, A. A. (2021). Modification of plant proteins for improved functionality: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1): 198-224, doi.org/10.1111/1541-4337.12688.

Alavi, F., Chen, L., Wang, Z., Emam-Djomeh, Z. (2021). Consequences of heating under alkaline pH alone or in the presence of maltodextrin on solubility, emulsifying and foaming properties of faba bean protein. *Food Hydrocolloids*, 112: 106335, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106335.

Alu'datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Ereifej, K., Gammoh, S., Kubow, S., Tawalbeh, D. (2017). Preparation of mayonnaise from extracted plant protein isolates of chickpea, broad bean and lupin flour: chemical, physiochemical, nutritional and therapeutic properties. *Journal of*

*Food Science and Technology*, 54(6): 1395-1405, doi.org/10.1007/s13197-017-2551-6.

AOAC, C. (2005). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official Methods: Gaithersburg, MD, USA.

Ata, O., Kumcuoglu, S., Tavman, S. (2022). Effects of sonication on the extraction of pepsin-soluble collagens from lamb feet and product characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 159: 113253, doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113253.

Aydemir, L. Y., Yemenicioğlu, A. (2013). Potential of Turkish Kabuli type chickpea and green and red lentil cultivars as source of soy and animal origin functional protein alternatives. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2): 686-694, doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.023.

Balasubramaniam, V. M., Martínez-Monteağudo, S. I., Gupta, R. (2015). Principles and Application of High Pressure-Based Technologies in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1): 435-462, doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015539.

Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food Research International*, 43(2): 537-546, doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.021.

Boye, J., Zare, F., Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2): 414-431, doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.003.

Başıyigit, B., Yücepete, M., Karaaslan, A., Karaaslan, M. (2021). High efficiency microencapsulation of extra virgin olive oil (EVOO) with novel carrier agents: Fruit proteins. *Materials Today Communications*, 28: 102618, doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102618.

Cai, R., McCurdy, A., Baik, B.-K. (2002). Textural Property of 6 Legume Curds in Relation to their Protein Constituents. *Journal of Food Science*, 67(5):

- 1725-1730, doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08713.x.
- Cano-Medina, A., Jiménez-Islas, H., Dendooven, L., Herrera, R. P., González-Alatorre, G., Escamilla-Silva, E. M. (2011). Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. *Food Research International*, 44(3): 684-692, doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.015.
- Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I., Jang, D. H., Lee, Y. B., Kim, S. B. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids*, 18(4): 573-579, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.10.001.
- Conde, J. M., del Mar Yust Escobar, M., Pedroche Jiménez, J. J., Rodríguez, F. M., Rodríguez Patino, J. M. (2005). Effect of Enzymatic Treatment of Extracted Sunflower Proteins on Solubility, Amino Acid Composition, and Surface Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20): 8038-8045, doi.org/10.1021/jf051026i.
- Damodaran, S. (2006). Protein Stabilization of Emulsions and Foams. *Journal of Food Science*, 70(3): R54-R66, doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x.
- Das, D., Panesar, P. S., Saini, C. S. (2023). Ultrasonic extraction of soy protein isolate: Characterization and comparison with microwave and enzymatic extraction methods. *Journal of Food Science*, 88(7): 2758-2779, doi.org/10.1111/1750-3841.16654.
- Day, L., Cakebread, J. A., Loveday, S. M. (2022). Food proteins from animals and plants: Differences in the nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 119: 428-442, doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.020.
- de Paiva Gouvêa, L., Caldeira, R., de Lima Azevedo, T., Galdeano, M. C., Felberg, I., Lima, J. R., Grassi Mellinger, C. (2023). Physical and techno-functional properties of a common bean protein concentrate compared to commercial legume ingredients for the plant-based market. *Food Hydrocolloids*, 137: 108351, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108351.
- Du, Q., Zhou, L., Lyu, F., Liu, J., Ding, Y. (2022). The complex of whey protein and pectin: Interactions, functional properties and applications in food colloidal systems – A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 210: 112253, doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112253.
- Duangmal, K., Saicheua, B., Sueeprasan, S. (2008). Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. *LWT-Food Science and Technology*, 41(8): 1437-1445, doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.014.
- El Fiel, H. E. A., El Tinay, A. H., Elsheikh, E. A. E. (2002). Effect of nutritional status of faba bean (*Vicia faba* L.) on protein solubility profiles. *Food Chemistry*, 76(2): 219-223, doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00314-9.
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J.-B., Chen, B., Rao, J. (2020). Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131: 109045, doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045.
- Gharibzahedi, S. M. T., Smith, B. (2020). The functional modification of legume proteins by ultrasonication: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98: 107-116, doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.002.
- Gochev, G., Retzlaff, I., Exerowa, D., Miller, R. (2014). Electrostatic stabilization of foam films from  $\beta$ -lactoglobulin solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 460: 272-279, doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.037.
- Görgüç, A., Bircan, C., Yılmaz, F. M. (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 283: 637-645, doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.077.
- Görgüç, A., Özer, P., Yılmaz, F. M. (2020). Microwave-assisted enzymatic extraction of plant protein with antioxidant compounds from the food waste sesame bran: Comparative optimization study and identification of metabolomics using LC/Q-TOF/MS. *Journal of*

- Food Processing and Preservation*, 44(1): e14304, doi.org/10.1111/jfpp.14304.
- Grdadolnik, J. (2003). Saturation effects in FTIR spectroscopy: intensity of amide I and amide II bands in protein spectra. *Acta chimica slovenica*, 50(4): 777-788.
- Haris, P. I. (2013). Probing protein–protein interaction in biomembranes using Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(10): 2265-2271, doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.008.
- Hughes, G. J., Ryan, D. J., Mukherjea, R., Schasteen, C. S. (2011). Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores (PDCAAS) for Soy Protein Isolates and Concentrate: Criteria for Evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23): 12707-12712, doi.org/10.1021/jf203220v.
- Kapoore, R., Butler, T., Pandhal, J., Vaidyanathan, S. (2018). Microwave-Assisted Extraction for Microalgae: From Biofuels to Biorefinery. *Biology*, 7(1): 18, doi.org/10.3390/biology7010018.
- Karaca, A. C., Low, N., Nickerson, M. (2011). Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*, 44(9): 2742-2750, doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012.
- Kim, W., Wang, Y., Selomulya, C. (2020). Dairy and plant proteins as natural food emulsifiers. *Trends in Food Science & Technology*, 105: 261-272, doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.012.
- Kosińska, A., Karamać, M., Penkacik, K., Urbalewicz, A., Amarowicz, R. (2011). Interactions between tannins and proteins isolated from broad bean seeds (*Vicia faba* Major) yield soluble and non-soluble complexes. *European Food Research and Technology*, 233(2): 213-222, doi.org/10.1007/s00217-011-1506-9.
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Reetu, Punia, S., Dhakane-Lad, J., Singh, S., Dhumal, S., Chandra Pradhan, P., Bhushan, B., Anitha, T., Alajil, O., Alhariri, A., Amarowicz, R., Kennedy, J. F. (2022). Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids*, 123: 106986, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106986.
- Kumar, M., Tomar, M., Punia, S., Dhakane-Lad, J., Dhumal, S., Changan, S., Senapathy, M., Berwal, M. K., Sampathrajan, V., Sayed, A. A. S., Chandran, D., Pandiselvam, R., Rais, N., Mahato, D. K., Udikeri, S. S., Satankar, V., Anitha, T., Reetu, Radha, ... Kennedy, J. F. (2022). Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications. *LWT-Food Science and Technology*, 154: 112620, doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112620.
- Kute, A., Mohapatra, D., Babu, B., Sawant, B. P. (2015). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel using response surface methodology. *Journal of Food Research and Technology*, 3(2): 62-70.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685, doi.org/10.1038/227680a0.
- Lam, A. C. Y., Warkentin, T. D., Tyler, R. T., Nickerson, M. T. (2017). Physicochemical and Functional Properties of Protein Isolates Obtained from Several Pea Cultivars. *Cereal Chemistry*, 94(1): 89-97, doi.org/10.1094/CCHEM-04-16-0097-FI.
- Lee, H. W., Lu, Y., Zhang, Y., Fu, C., Huang, D. (2021). Physicochemical and functional properties of red lentil protein isolates from three origins at different pH. *Food Chemistry*, 358: 129749, doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129749.
- Lei, M., Jiang, F.-C., Cai, J., Hu, S., Zhou, R., Liu, G., Wang, Y.-H., Wang, H.-B., He, J.-R., Xiong, X.-G. (2018). Facile microencapsulation of olive oil in porous starch granules: Fabrication, characterization, and oxidative stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 755-761, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.051.
- Li, Q., Wang, Z., Dai, C., Wang, Y., Chen, W., Ju, X., Yuan, J., He, R. (2019). Physical stability and microstructure of rapeseed protein isolate/gum Arabic stabilized emulsions at alkaline pH. *Food*

- Hydrocolloids*, 88: 50-57, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.09.020.
- Li, X., Shi, J., Scanlon, M., Xue, S. J., Lu, J. (2021). Effects of pretreatments on physicochemical and structural properties of proteins isolated from canola seeds after oil extraction by supercritical-CO<sub>2</sub> process. *LWT-Food Science and Technology*, 137: 110415, doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110415.
- Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275, doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramirez, J., Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44: 97-105, doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.007.
- Mcclements, D. J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(7): 611-649, doi.org/10.1080/10408390701289292.
- Multari, S., Stewart, D., Russell, W. R. (2015). Potential of Fava Bean as Future Protein Supply to Partially Replace Meat Intake in the Human Diet. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(5): 511-522, doi.org/10.1111/1541-4337.12146.
- Pelegrine, D. H. G., Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1): 77-80, doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013.
- Phuangjit, U., Klinkesorn, U., Tan, C. P., & Katekhong, W. (2024). Enhancing silkworm protein yield, extraction efficiency, structure, functionality, and antioxidant activity using ultrasound-, microwave-, and freeze-thaw-assisted methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 104(1): 383-390, doi.org/10.1002/jsfa.12929.
- Quanhong, L., Caili, F. (2005). Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein. *Food Chemistry*, 92(4): 701-706, doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.042.
- Sharan, S., Zanghelini, G., Zotzel, J., Bonerz, D., Aschoff, J., Saint-Eve, A., Maillard, M. N. (2021). Fava bean (*Vicia faba* L.) for food applications: From seed to ingredient processing and its effect on functional properties, antinutritional factors, flavor, and color. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1): 401-428, doi.org/10.1111/1541-4337.12687.
- Sharma, A., Jana, A. H., Chavan, R. S. (2012). Functionality of Milk Powders and Milk-Based Powders for End Use Applications—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(5): 518-528, doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00199.x.
- Shen, Y., Li, Y. (2021). Acylation modification and/or guar gum conjugation enhanced functional properties of pea protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 117: 106686, doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106686.
- Springmann, M., Clark, M., Mason-D'Croz, D., Wiebe, K., Bodirsky, B. L., Lassaletta, L., ... & Willett, W. (2018). Options for keeping the food system within environmental limits. *Nature*, 562(7728): 519-525, doi.org/10.1038/s41586-018-0594-0.
- Stehfest, E., Bouwman, L., Van Vuuren, D. P., Den Elzen, M. G., Eickhout, B., & Kabat, P. (2009). Climate benefits of changing diet. *Climatic change*, 95(1): 83-102, doi.org/10.1007/s10584-008-9534-6.
- Stone, A. K., Karalash, A., Tyler, R. T., Warkentin, T. D., Nickerson, M. T. (2015). Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars. *Food Research International*, 76: 31-38, doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.017.
- Vagadia, B., Vanga, S., Singh, A., Garipey, Y., Raghavan, V. (2018). Comparison of Conventional and Microwave Treatment on Soymilk for Inactivation of Trypsin Inhibitors



and In Vitro Protein Digestibility. *Foods*, 7(1): 6, doi.org/10.3390/foods7010006.

Varghese, T., Pare, A. (2019). Effect of microwave assisted extraction on yield and protein characteristics of soymilk. *Journal of Food Engineering*, 262: 92-99, doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.020.

Vioque, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J. (2012). Nutritional and functional properties of Vicia faba protein isolates and related fractions. *Food Chemistry*, 132(1): 67-72, doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.033.

Wang, W., Du, G., Li, C., Zhang, H., Long, Y., Ni, Y. (2016). Preparation of cellulose nanocrystals

from asparagus (*Asparagus officinalis* L.) and their applications to palm oil/water Pickering emulsion. *Carbohydrate Polymers*, 151: 1-8, doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.052.

Zhao, X., Fan, X., Shao, X., Cheng, M., Wang, C., Jiang, H., Zhang, X., & Yuan, C. (2022). Modifying the physicochemical properties, solubility and foaming capacity of milk proteins by ultrasound-assisted alkaline pH-shifting treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 88: 106089, doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106089.



## TECHNO-FUNCTIONAL PROPERTIES OF CHICKPEA PROTEIN ISOLATE-TREATED ACIDIC AND BASIC PH-CYCLING

**Gulsah KARABULUT\***

Sakarya University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Sakarya, Türkiye

Received /Geliş: 29.03.2024; Accepted/Kabul: 20.09.2024; Published online/Online baskı: 25.09.2024

Karabulut, G. (2024). *Techno-functional properties of chickpea protein isolate-treated acidic and basic pH-cycling*. GIDA (2024) 49 (5) 879-890\* doi: 10.15237/gida.GD24038

Karabulut, G. (2024). Asidik ve bazik pH-değiştirme uygulanmış nohut proteinlerinin teknofonksiyonel özellikleri. GIDA (2024) 49 (5) 879-890 doi: 10.15237/gida.GD24038

### ABSTRACT

This study examined the impact of extreme pH-cycling treatments on chickpea protein isolate (CPI). Untreated CPI, along with samples shifted to pH 2 (pH2) and pH 12 (pH12), displayed solubilities of 60.25%, 25.01%, and 75.48%, respectively. Both treatments significantly improved water and oil absorption capacities. Emulsion activity and stability for CPI at pH2 and pH12 were 125 m<sup>2</sup>/g and 110 m<sup>2</sup>/g, respectively, versus 75 m<sup>2</sup>/g for the untreated sample. Notably, the foaming capacity and stability of pH12-treated CPI increased by 3.5 and 8.8 times, respectively, compared to the untreated protein. pH12-treated CPI also demonstrated the lowest gelling concentration at 10%, compared to 14% and 18% for untreated and pH2-treated CPI, respectively. Microstructural analysis revealed partial disintegration of CPI under pH-cycling, underscoring that alkaline pH12-shifting notably enhances functional properties of CPI.

**Keywords:** Chickpea, pH-cycling, modification, plant protein, functionality

### ASİDİK VE BAZİK PH-DEĞİŞTİRME UYGULANMIŞ NOHUT PROTEİNLERİNİN TEKNOFONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ

#### ÖZ

Bu çalışma, nohut protein izolatu (CPI) üzerindeki pH değiştirme uygulamasının etkisini incelemiştir. Uygulama yapılmamış CPI ile pH 2'ye (pH2) ve pH 12'ye (pH12) değiştirme uygulanmış örnekler sırasıyla %60.25, %25.01 ve %75.48 çözünürlük göstermiştir. Her iki uygulamada su ve yağ bağlama kapasitelerini önemli ölçüde artırmıştır. pH2 ve pH12'de uygulanmış CPI için emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi sırasıyla 125 m<sup>2</sup>/g ve 110 m<sup>2</sup>/g iken, uygulama yapılmamış örnek için bu değer 75 m<sup>2</sup>/g'dir. Özellikle, pH12 değiştirme uygulanmış CPI'nin köpük kapasitesi ve stabilitesi, uygulama yapılmamış proteine kıyasla sırasıyla 3.5 ve 8.8 kat artmıştır. pH12 uygulanan CPI ayrıca, uygulama yapılmamış ve pH2 uygulanan CPI'ye göre sırasıyla %14 ve %18 olan jel oluşum konsantrasyonunda en düşük değer olan %10'u göstermiştir. Mikroyapısal analiz, CPI'nin pH değiştirme ile kısmi olarak denatüre olduğunu ortaya koymuş ve pH12 değiştirme uygulamasının CPI'nin fonksiyonel özelliklerini belirgin şekilde artırdığını vurgulamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Nohut, pH-değiştirme, modifikasyon, bitkisel protein, fonksiyonel

\* Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: gkarabulut@sakarya.edu.tr

☎ (+90)543 672 0688

Gulsah Karabulut; ORCID no: 0000-0002-4540-3044

## INTRODUCTION

The increasing demand for alternatives to animal protein has grown the rapid expansion of plant-based proteins within the food sector. Traditional sources like wheat and soy face problems over allergenic concerns, leading a shift towards pulses like peas, fava beans, chickpeas, lupins, and lentils, which are emerging as key dietary components globally due to their farming benefits and nutritional value (Bessada et al., 2019). Notably, chickpea protein stands out for its higher levels of essential amino acids (lysine and arginine), superior digestibility, and lower allergen potential, attracting attention from food industry (Wang et al., 2021).

Nonetheless, recent research has indicated that solubility issues of chickpea protein (Chang et al., 2022; Tang et al., 2021) present challenges for its broader application in the food industry. These solubility issues are primarily attributed to the inherent structural properties of protein and its interaction with other food components, which can affect its functionality in different food matrices. For instance, the globulin and albumin fractions of chickpea protein tend to aggregate under certain processing conditions, leading to reduced solubility and functionality (Tang et al., 2021).

This reduced solubility not only hinder the ability of protein to be efficiently incorporated into various food products but also impacts its sensory attributes and consumer acceptance. Furthermore, the processing methods employed to isolate and purify chickpea protein can increase these solubility issues. For example, high-temperature treatments, enzymatic hydrolysis, and pH adjustments, commonly used in protein extraction, can lead to protein denaturation and aggregation, further decreasing solubility (Chang et al., 2022). Enzymatic hydrolysis can break down protein aggregates into smaller peptides, enhancing solubility and bioavailability (Wang et al., 2021). Ultrasonication, which uses high-frequency sound waves, can disrupt protein aggregates and improve dispersion in aqueous solutions (Tang et al., 2021). Chemical modifications, such as phosphorylation and

glycosylation, can alter the surface properties of chickpea protein, reducing hydrophobic interactions and enhancing solubility (Chang et al., 2022).

Among the modification approaches, pH-shifting is a simple, adaptable, and safe method for modifying protein structures. This method involves subjecting proteins to extremely acidic or alkaline conditions, well away from their isoelectric points, causing an increase in repulsive forces among protein molecules, which leads to their partial unfolding (Karabulut et al., 2024). The extreme pH conditions disrupt the electrostatic interactions and hydrogen bonds within the protein, destabilizing its native structure. Subsequently, when the pH is neutralized to 7, proteins refold into a more flexible configuration referred to as the "molten state" (Wang et al., 2020). This state is characterized by a less ordered, more flexible conformation that enhances the protein's functional properties, such as solubility, emulsification, and gelation capabilities. This unfolding and refolding cycle profoundly modifies the proteins' structure and functionality, enabling their application in various food formulations. For instance, treating soybean protein with pH shifting at pH 2 selectively unfolds the 11S globulin, enhancing its surface hydrophobicity and significantly boosting its foaming capacity and stability (Jiang et al., 2018). Another researchers demonstrated the efficacy of pH shifting in enhancing the gelling and emulsifying traits of various plant proteins (Li and Wu et al., 2020; Wang et al., 2018). Furthermore, combining ultrasound with pH shifting has been identified as particularly effective in enhancing protein functionalities, as proteins unfolded at extreme pH levels are more susceptible to ultrasound. For example, this synergistic approach markedly enhanced the solubility of proteins from soybeans (Lee et al., 2016), peas (Jiang et al., 2017), rice (Zhang et al., 2018), and rapeseed (Li et al., 2020) beyond what either pH shifting or ultrasound could achieve independently. Yet, investigations into using pH shifting to improve functional attributes of plant proteins, particularly CPI, remain scarce.

The current study is aimed to: (i) explore the effects of acidic and basic pH cycling on chickpea proteins, and (ii) investigate the functional and morphological properties of these proteins. Our research seeks to offer an accessible and efficient approach to enhance the functionality of chickpea protein, thereby widening its application in the food industry.

## MATERIALS AND METHODS

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) was purchased by the local market (Sakarya, Türkiye). All chemicals were purchased from Sigma (Steinheim, Germany) with technical and higher grades. Distilled water was used in all experiments.

### Extraction of Chickpea Protein Isolate

Chickpeas were first ground using a blender (Waring, USA) and then deoiled using hexane for 8 hours in a Soxhlet apparatus. The deoiled chickpea powders were air-dried overnight and subsequently ground into flour using a grain mill. To ensure uniformity, the ground flour was sifted through a 40-mesh sieve to produce consistent chickpea flour. This flour was then used to obtain CPI following the alkali extraction-isoelectric point precipitation method described by Malomo et al. (2014).

In summary, the deoiled flour was mixed with distilled water at a 1:20 w/v ratio, and the pH of the suspension was adjusted to 10.0 using 2 N NaOH. This suspension was stirred at a constant speed of 450 rpm at a steady pH of 10.0 for 2 hours at 37°C. After stirring, the mixture was centrifuged at 13000  $xg$  for 25 minutes at 4°C using a centrifuge (Hettich Universal 320R, Germany) to separate the supernatant. The pH of the supernatant was then adjusted to 4.5 (the isoelectric point) using 2 N HCl, and centrifuged again under the same conditions to collect the pellet. This pellet was redissolved in distilled water and neutralized to a pH of 7.0 using 2 N NaOH. The resulting solution was freeze-dried using a lyophilizer (Labconco Freezone 6, USA), labeled as "Untreated", and stored at 4°C for further analysis.

The proximate composition of CPI was analyzed and found to consist of  $90.2 \pm 0.5\%$  protein,  $0.3 \pm 0.0\%$  lipid,  $5.6 \pm 0.0\%$  ash, and  $3.9 \pm 0.2\%$  carbohydrates, calculated on a dry weight basis in accordance with the guidelines set by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). Protein content, calculated as nitrogen multiplied by 6.25, was measured using a Nitrogen Analyzer (Velp NDA 701, Italy), using the Dumas method.

### pH-cycling Process

The pH-cycling treatments, involving pH shifts to pH 2 and pH 12, were referenced from Jiang et al. (2018).

pH2-shifting treatment (pH2): A 3% (w/v) suspension of CPI was acidified to a pH of 2 using 2 N HCl, aiming to unfold the protein structures at room temperature. This acidified suspension was held at a stable pH of 2.0 for 1 hour, then neutralized back to pH 7.0 using 2 N NaOH. The neutral protein solutions were freeze-dried, labeled as "pH2", and stored at 4°C for further analysis.

pH12-shifting treatment (pH12): In a similar procedure, a 3% (w/v) CPI suspension was adjusted to an alkaline pH of 12 using 2 N NaOH to facilitate protein unfolding at room temperature. The solution was maintained at a constant pH of 12.0 for 1 hour before being neutralized back to pH 7.0 using 2 N HCl. The neutralized protein solutions were then freeze-dried and stored at 4°C, labeled as "pH12", for further analysis.

### Solubility

Protein solubility was assessed using a modified method of Bradford (1976). In this procedure, 150  $\mu$ L of a protein solution (3 mg/mL) was mixed with 3 mL of commercial Bradford dye reagent (Bio-Rad, USA). The mixture was incubated for 10 minutes to allow the reaction, followed by measuring the absorbance at 595 nm using a spectrophotometer (Shimadzu UV-Mini 1240, Japan). Bovine serum albumin was used as the standard reference protein solution

(correlation coefficient ( $R^2$ ): 0.992). Protein solubility was calculated using the Equation (1).

$$\text{Solubility (\%)} = \frac{P_{\text{supernatant}}}{P_{\text{isolate}}} \times 100 \quad (1)$$

where  $P_{\text{supernatant}}$  is the protein content in soluble part (mg/mL),  $P_{\text{isolate}}$  is the protein content of protein isolate (mg/mL).

### Emulsion Activity and Stability

The emulsion activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) of CPI were assessed using a slightly modified version of Pearce and Kinsella (1978) method. 4 mL of CPI solution (10 mg/mL) was mixed with 1 mL of sunflower oil in a beaker. The mixture was homogenized using an ultraturrax mixer (IKA, T20, Germany) at 10000 rpm for 2 minutes. After homogenization, a 25  $\mu$ L aliquot of the emulsion was taken from the bottom of the beaker and diluted with 10 mL of a 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) solution. The EAI and ESI were determined by measuring the absorbance of the diluted emulsion at 500 nm using a spectrophotometer. Absorbance measurements were taken immediately and again after 10 minutes to calculate the EAI and ESI, respectively, using the given Equations (2) and (3).

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times \text{DF}}{C \times \varnothing \times \partial \times 10000} \quad (2)$$

$$\text{ESI (min)} = \frac{A_0 \times \Delta t}{A_0 - A_{10}} \quad (3)$$

where DF is the dilution factor, 2.303 is converts the absorbance value (which is typically measured as an optical density) to the natural logarithm scale, aligning with the Lambert-Beer law for absorbance measurements., 10000 is converts the g of protein concentration and cm of optical path, C is the concentration of protein (g/mL),  $\varnothing$  is the optical path (1 cm),  $\partial$  is an oil fraction in the emulsion (v/v, 1/5=0.20), and  $A_0$  and  $A_{10}$  are the absorbances of emulsions after 0 min and 10 min, respectively.

### Foaming Capacity and Stability

Foaming capacity (FC) and stability (FS) were evaluated with slight modifications from the

method of Karabulut et al. (2022). Protein suspensions (20 mL) at a concentration of 10 mg/mL in distilled water, adjusted to pH 7.0, were homogenized at 10000 rpm for 2 minutes using a homogenizer (IKA T20, Germany) to obtain foam. FC and FS were then determined using Equation (4) for FC and Equation (5) for FS, respectively.

$$\text{FC (\%)} = \frac{V_0 - 20}{20} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{FS (\%)} = \frac{V_{10} - 20}{V_0 - 20} \times 100 \quad (5)$$

where  $V_0$  is the volume after whipping at 0 min,  $V_{10}$  is the volume after 10 min. of the CPI suspension

### The Least Gelling Concentration

Protein solutions (2% to 20%, w/v) were subjected to thermal treatment in a water bath maintained at 90°C for one hour. After heating, the samples were quickly cooled to room temperature and then stored at 4°C for two hours to facilitate gelation. Following the gelation period, the flow properties of the protein gels were assessed by inverting the test tubes containing the gels. The lowest concentration at which the protein formed a gel that did not move or slide down the inner surface of the inverted tube was identified as the least gelling concentration (LGC, % w/v). This determination of LGC for the protein isolates follows the methodology described by Karabulut and Yemiş (2022).

### Water and Oil Absorption Capacity

The water and oil absorption capacities of CPI were evaluated using a modified procedure of Karabulut et al. (2022). A 50 mg of CPI was mixed with 1.5 mL of distilled water (pH 7.0) or 1.5 mL of sunflower oil in separate experiments. Each mixture was shaken for 20 seconds and then allowed to stand for 30 minutes at room temperature to enable thorough absorption. Following the resting period, the mixtures were centrifuged at 7000 xg for 20 minutes at 4°C. After centrifugation, the supernatant was gently decanted, and the tubes were left undisturbed for an additional 20 minutes to facilitate complete

drainage of any residual supernatant. The water absorption capacity (WAC) and oil absorption capacity (OAC) of CPI were quantified by recording the change in net weight of the samples after the absorption and centrifugation processes, as described in Equations 6 and 7.

$$WAC (\%) = \frac{m_{2w} - m_{1w}}{m_{1w}} \times 100 \quad (6)$$

$$OAC (\%) = \frac{m_{2o} - m_{1o}}{m_{1o}} \times 100 \quad (7)$$

where  $m_{1w}$ ,  $m_{1o}$  are initial weight (mg) and  $m_{2w}$ ,  $m_{2o}$  final weight (mg) of protein isolates after water/oil addition, respectively.

### Morphology

The microstructural properties of CPI powders were analyzed using a scanning electron microscope (SEM, S-4700, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan). For examination, samples were mounted on conductive carbon adhesive tape and sputter-coated with a gold-platinum alloy for 60 seconds to prevent charging under the electron beam.

Imaging was conducted at an accelerating voltage of 10 kV, covering a range of magnifications from 100x to 1000x.

### Statistical Analysis

All experimental treatments and analyses were performed in triplicate, with results reported as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical evaluations were conducted using the SPSS 20.0 software package (SPSS Inc., Chicago, USA). The data were subjected to a one-way ANOVA to test for significant differences, with a significance level set at a 95% confidence interval ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### Solubility

Protein solubility is a crucial functional attribute that influences emulsifying and digestive qualities, as well as various other functional characteristics (Tontul et al., 2018). The changes in CPI solubility following the pH-shifting procedure are shown in Figure 1a.

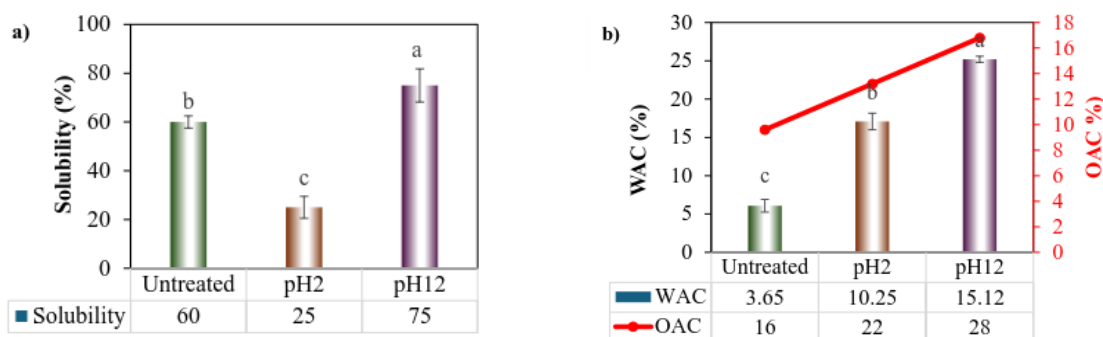


Figure 1. a) Solubility (%) and b) water/oil absorption capacity (%), WAC, %, OAC) of chickpea protein isolates (CPI). Untreated: control CPI, pH2: pH2-shifted CPI, and pH12: pH12-shifted CPI.

The maximum protein solubility, recorded at 75%, was observed with pH 12 shifting, while the solubility with pH 2 shifting was 25%, which was lower than that of untreated protein. The pH 12-shifting procedure enhanced CPI solubility, aligning with the outcomes of prior research. However, solubility was reduced with pH 2-shifting compared to untreated CPI, likely due to extensive aggregation at pH 2, approximating the

isoelectric point of CPI, leading to increased sedimentation (Wang et al., 2022).

Previous studies have reported significant improvements in chickpea protein solubility following pH cycling. For example, Wang et al. (2024) observed that chickpea protein isolate solubility increased from 65% to 73% post pH 12 treatment. Similarly, Jiang et al. (2017) reported that pH 12 treatment boosted pea protein isolate

(PPI) solubility from 8.17% in the control to 54.94%. Factors such as pH, temperature, and ionic strength are known to influence protein solubility (Bolontrande et al., 2013).

This pH shifting technique has also been shown to elevate protein solubility in other plant proteins. Yildiz et al. (2017) reported that pH 12 treatment significantly increased the solubility of soy protein to 57.0%, compared to 9.1% in untreated protein samples. Additionally, exposing proteins to extreme pH levels, such as pH 12 or pH 2, can cause partial unfolding, with subsequent readjustment to pH 7 aiding in their refolding. This process, known for altering protein properties, may enhance CPI solubility due to increased protein-water ionic interactions (Jiang et al., 2010; Yildiz et al., 2017).

#### Water and Oil Absorption Capacity

The capacity of protein isolates to absorb water or oil measures their ability to bind with these substances, quantified by the volume of water or oil a gram of protein isolate can incorporate. These properties, reflecting the balance between hydrophilic and hydrophobic attributes, significantly impact storage-related quality aspects like texture and brittleness. In Figure 1b, the absorption capacities for CPI and pH-shifted CPIs are detailed. Both pH-shifted proteins exhibited better water and oil absorption capacities than the untreated chickpea protein. Studies by Malik et al. (2018) and Resendiz-Vazquez et al. (2017) have highlighted that an

increase in surface hydrophobicity can enhance interactions between proteins and oil, a correlation less evident in water absorption. The dynamics of water and oil absorption depend on the interplay between hydrophilic and hydrophobic forces within the protein, influenced by factors such as ionic strength, protein-water interactions, and overall protein solubility (Malomo et al., 2014).

Figure 1b illustrates that pH-shifting treatment enriched the protein surface with hydrophobic groups, which naturally gravitate towards oil, enhancing oil absorption. This enhanced oil absorption capability can positively impact the shelf life of food products by minimizing oil separation and preserving flavor compounds.

#### Emulsion Activity and Stability

The EAI and ESI are crucial metrics that demonstrate a protein's emulsifying capability. Proteins facilitate emulsification by encasing oil droplets within a film, which are then dispersed in water, thereby inhibiting emulsion destabilization processes such as coalescence, creaming, or sedimentation. The EAI quantifies the volume of oil that can be emulsified by a specific amount of protein, whereas the ESI measures how well the emulsion maintains its integrity over time (Boye et al., 2010).

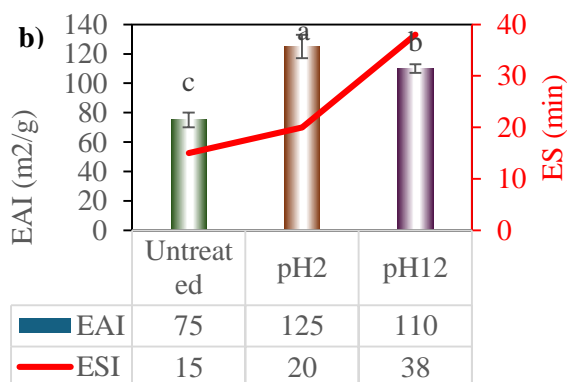
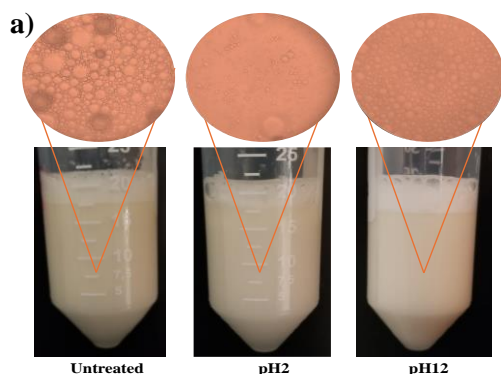


Figure 2. a) Emulsion morphology and b) emulsion activity index (EAI) and emulsion stability (ES) of chickpea protein isolates (CPI). Untreated: control CPI, pH2: pH2-shifted CPI, and pH12: pH12-shifted CPI.

Micrographs presented in Figure 2a depict the morphological characteristics of emulsion droplets for CPI treated at pH 12 and pH 2, alongside untreated CPI. Both pH-treated emulsions displayed uniformly small droplet sizes, in contrast to the untreated isolate, which exhibited larger and more variably distributed droplet sizes. Figure 2b illustrates the EAI and ESI for chickpea protein isolate (CPI) under various conditions: untreated, and subjected to pH adjustments to 2 and 12. The CPI treated at pH 12 demonstrated an enhanced EAI of 110 m<sup>2</sup>/g, surpassing that of the untreated CPI (75 m<sup>2</sup>/g), but lower than the pH 2-shifted CPI (125 m<sup>2</sup>/g). Similar trends were observed in ESI measurements, where pH 12-shifted CPI (38 min) showed better stability than untreated CPI (15 min).

This evidence supports the hypothesis that treatment at pH 12 augments both the formation and stability of emulsions. The augmentation in EAI and ESI attributable to the pH 12 shift may be related to the unveiling of internal hydrophobic domains within the protein molecules (Cabra et al., 2007; Arzeni et al., 2012). Alkaline pH-shifting treatments induce protein denaturation, facilitating the exposure of hydrophobic regions to the surrounding aqueous environment (Lee et al., 2016; Wang et al., 2018). Such structural modifications improve the hydrophilic-lipophilic balance of the proteins, enhancing their efficacy at the oil-water interface.

This phenomenon was supported by research showing that pH-shifting treatments induce protein conformation changes into a molten globule state through unfolding and partial refolding, making the proteins more susceptible to physical modifications (Choe et al., 2022; Dijkstra et al., 2018). In this state, proteins exhibit a reduction in tertiary structural integrity and a loosening of tightly packed amino acid side chains, resulting in a disordered tertiary conformation with an expanded hydrophobic

surface area. The enhanced emulsification properties may also stem from the generation of flexible random coil structures during treatment and a notable increase in protein solubility, which boosts the protein concentration in suspension and promotes more effective oil droplet adsorption.

### **Foaming Capacity and Stability**

The foaming characteristic of proteins is associated with their ability to create a sticky, elastic film at the air-water interactions (Wang & Damodaran, 1991). Figures 3a and 3b show the foaming properties of CPI. The FC% and FS% values increased by more than 3 and 8 times, respectively, after extreme acidic and basic pH-cycling treatments compared to untreated CPI. This phenomenon likely results from CPI undergoing partial unfolding at extremely high or low pH levels, followed by partial refolding at neutral pH, leading to a molten globule configuration (Jiang et al., 2018). This process enhanced surface hydrophobicity and reduces particle size.

Additionally, the cavitation and turbulence effects from intense ultrasound exposure promote the translocation of hydrophobic groups from the core of protein to its surface, increasing surface hydrophobicity and further reducing particle size. The significance of the hydrophobic area is crucial for protein adhesion at the air-water interface (Jiang et al., 2018), facilitating easier adsorption and yielding more stable foams.

At pH 12, which is further from the isoelectric point of CPI than pH 2, protein repulsion is heightened, causing more dynamic unfolding and refolding of CPI. This results in more pronounced structural and physicochemical modifications, thereby improving the foaming qualities of pH 12-shifted CPI over pH 2-shifted CPI.



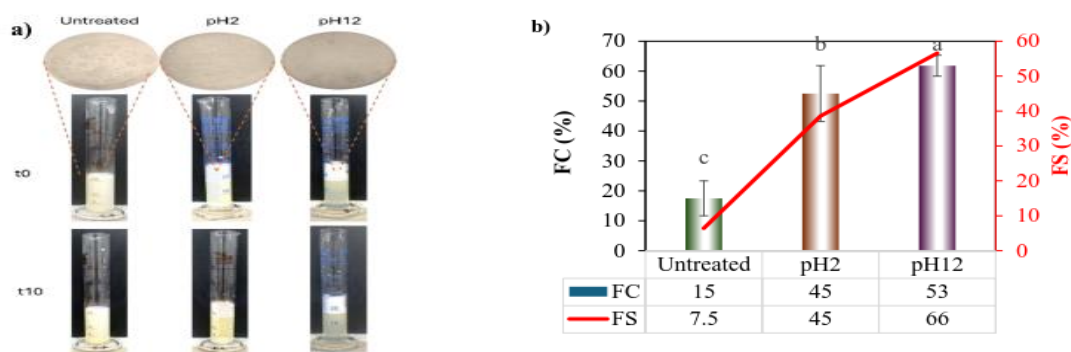


Figure 3. a) Foam morphology and b) foam capacity (FC) and foam stability (FS) of chickpea protein isolates (CPI). Untreated: control CPI, pH2: pH2-shifted CPI, and pH12: pH12-shifted CPI.

As seen in Figure 3a, the microstructural analysis of foam over various durations was analyzed to better understand the FA and FS of CPI. Specifically, smaller bubbles tend to form denser packings, which are less susceptible to structural changes, thereby enhancing the resistance of foam to liquid drainage (Xiong et al., 2018). Conversely, larger bubbles exhibit a greater tendency toward rupture and instability, leading to inferior foaming qualities (Zhao et al., 2021).

Foam inherently lacks thermodynamic stability; as time progresses, gravity induces liquid drainage, diminishing the volume of foam and altering its structure, as seen in the reduced film thickness and enlarged bubble size (Martinez-Velasco et al., 2018). These findings underscore that pH shifting

significantly enhanced foaming capability of CPI, particularly when CPI was treated at pH 12.

#### The Least Gelling Concentration

Protein gelation plays a vital role in the creation of various food products, including puddings, jellies, desserts, and meat-based items. The LGC is a measure used to determine the concentration at which proteins form a stable, self-supporting gel through a network of covalent and non-covalent linkages. The gelation process is influenced by multiple factors, including the size of protein, structural conformation, flexibility, and interactions among molecules, as well as the hydrophobicity and spatial arrangement of amino acids (Wang & Damodaran, 1991).

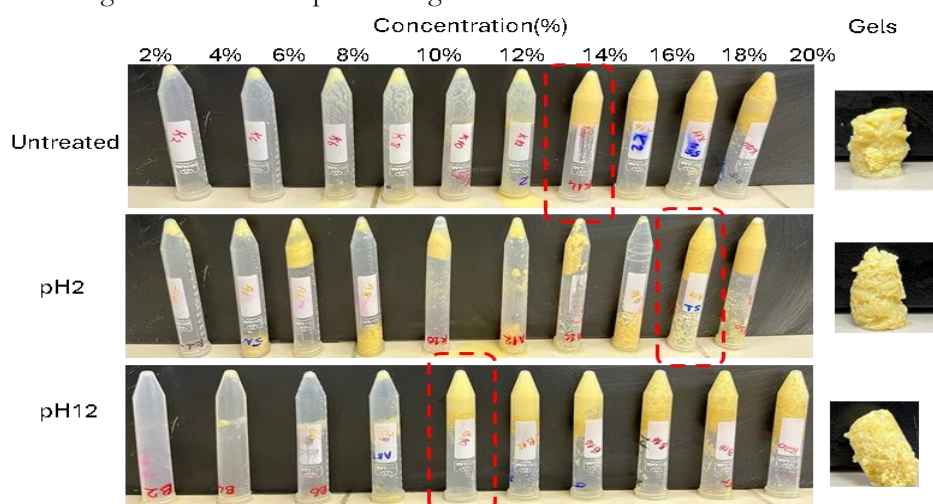


Figure 4. The gelling performance of chickpea protein isolates (CPI) at different concentrations (2-20%, w/w). Untreated: control CPI, pH2: pH2-shifted CPI, and pH12: pH12-shifted CPI.

As indicated in Figure 4, the application of pH-cycling enhanced the gelation abilities of pH 12-shifted CPI, reducing the LGC from 14% to 10%. Conversely, pH 2-shifted CPI showed the highest gelling concentration at 18%. Enhanced solubility aids in establishing the three-dimensional gel network proteins (Arzeni et al., 2012). The accessibility of these groups induce gelation through the creation of disulfide, hydrogen, hydrophobic, and van der Waals bonds. The partial unfolding and unordered particle size of

CPI enhance protein flexibility, crucial for constructing the three-dimensional gel matrix, thereby achieving a reduced LGC.

### Morphology

Scanning electron microscopy analyses were performed at magnifications ranging from 100× to 1000× to elucidate the morphological impacts of various treatments on chickpea protein isolate powders, as detailed in Figure 5.

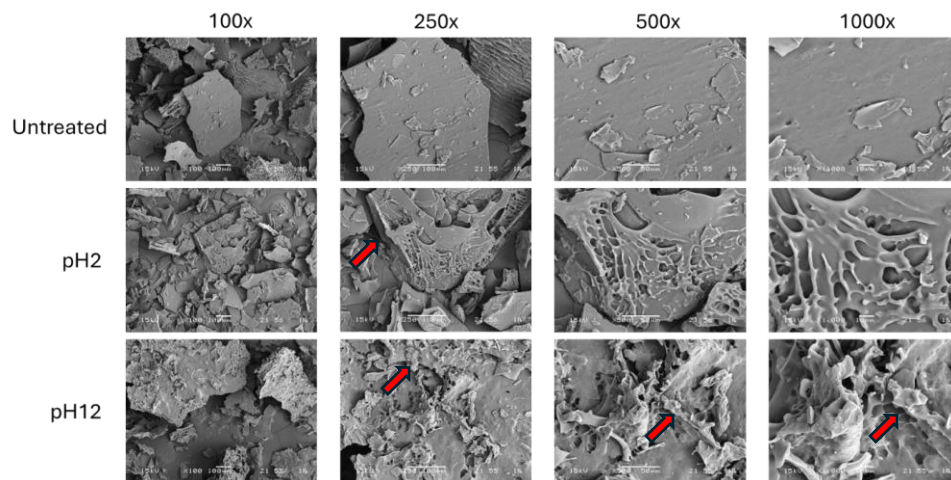


Figure 5. Morphological images of chickpea protein isolates (CPI) by Scanning Electron Microscopy (SEM). Untreated: control CPI, pH2: pH2-shifted CPI, and pH12: pH12-shifted CPI.

pH-cycling processes induced partial disintegration of the CPI, as evidenced by rough, flaky morphologies with pronounced edges in the SEM micrographs. These observations suggest the induction of molten globule states, characterized by the partial unfolding of protein structures, as reported by Zhang et al. (2019). The formation of cracked, irregular, and small fragments significantly increases the surface area of the treated proteins. This increase in surface area may show the observed enhancements in solubility and emulsion characteristics. Furthermore, the enhanced surface activity attributed to pH-shifting treatments enhances the interactions between oil and water with protein aggregates, thereby improving interfacial adsorption capabilities. The sheet-like structures following the integration of physical and chemical treatments was hypothesized to bolster hydrophobic interactions among protein surfaces,

as found by Yang et al. (2017). This change in protein morphology and surface properties highlighted the multifaceted effects of treatment methods on the functional properties of CPI, especially solubility and emulsion stability.

### CONCLUSIONS

This study aimed to assess the efficacy of a pH-shifting technique as a chemical method for altering and improving the functional properties of CPI. Among the different pH levels tested, applying a pH 12 condition notably enhanced the solubility, emulsifying properties, and foaming characteristics of CPI. These results highlight the effectiveness of pH 12 treatment as a promising method for protein modification, significantly enhancing essential functional properties of chickpea proteins. The pH-shifting technique utilized in this research demonstrates potential in

meeting the food industry's growing demand for broader applications of chickpea proteins.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that they have no conflicts of interest to this work. We declare that we do not have any commercial or associative interest that represents a conflict of interest in connection with the work submitted.

### CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

Gulsah Karabulut: Writing – review – editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Conceptualization, Funding acquisition.

### REFERENCES

- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.
- Bessada, S. M., Barreira, J. C., Oliveira, M. B. P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 53-68.
- Bolontrade, A. J., Scilingo, A. A., Anon, M.C. (2013). Amaranth proteins foaming properties: Adsorption kinetics and foam formation—Part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 319–327.
- Boye, J., Zare, F., Pletch, A. (2010). Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43(2), 414-431.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Cabra, V., Arreguin, R., Vazquez-Duhalt, R., Farres, A. (2007). Effect of alkaline deamidation on the structure, surface hydrophobicity, and emulsifying properties of the Z19  $\alpha$ -zein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 439-445.
- Chang, L., Lan, Y., Bandillo, N., Ohm, J. B., Chen, B., Rao, J. (2022). Plant proteins from green pea and chickpea: Extraction, fractionation, structural characterization and functional properties. *Food Hydrocolloids*, 123, 107165.
- Choe, U., Chang, L., Ohm, J. B., Chen, B., Rao, J. (2022). Structure modification, functionality and interfacial properties of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrate as affected by post-extraction treatments. *Food Hydrocolloids*, 133, 108000.
- Dijkstra, M. J. J., Fokkink, W. J., Heringa, J., van Dijk, E., Abeln, S. (2018). The characteristics of molten globule states and folding pathways strongly depend on the sequence of a protein. *Molecular Physics*, 116(21-22), 3173-3180.
- Jiang, J., Xiong, Y. L., Chen, J. (2010). pH shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8035-8042.
- Jiang, J., Wang, Q., Xiong, Y. L. (2018). A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins. *Current Opinion in Food Science*, 19, 50-56.
- Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T. M., Almajwal, A., Abulmeaty, M. M., Feng, H. (2017). Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835-842.
- Karabulut, G., Feng, H., Yemiş, O. (2022). Physicochemical and antioxidant properties of industrial hemp seed protein isolate treated by high-intensity ultrasound. *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(4), 577-583.
- Karabulut, G., Yemiş, O. (2022). Modification of hemp seed protein isolate (*Cannabis sativa* L.) by high-intensity ultrasound treatment. Part 1: Functional properties. *Food Chemistry*, 375, 131843.
- Lee, H., Yildiz, G., Dos Santos, L. C., Jiang, S., Andrade, J. E., Engeseth, N. J., Feng, H. (2016). Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH

- treatment and ultrasonication. *Food Hydrocolloids*, 55, 200-209.
- Li, J., Wu, M., Wang, Y., Li, K., Du, J., Bai, Y. (2020). Effect of pH-shifting treatment on structural and heat induced gel properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*, 325, 126921.
- Li, Y., Cheng, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Mintah, B. K., Dabbour, M., ... Ma, H. (2020). Modification of rapeseed protein by ultrasound-assisted pH shift treatment: Ultrasonic mode and frequency screening, changes in protein solubility and structural characteristics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 69, 105240.
- Malik, M. A., Saini, C. S. (2018). Rheological and structural properties of protein isolates extracted from dephenolized sunflower meal: Effect of high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 81, 229-241.
- Malomo, S. A., He, R., Aluko, R. E. (2014). Structural and functional properties of hemp seed protein products. *Journal of Food Science*, 79(8), C1512-C1521.
- Martínez-Velasco, A., Lobato-Calleros, C., Hernández-Rodríguez, B. E., Román-Guerrero, A., Alvarez-Ramírez, J., Vernon-Carter, E. J. (2018). High intensity ultrasound treatment of faba bean (*Vicia faba* L.) protein: Effect on surface properties, foaming ability and structural changes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 44, 97-105.
- Pearce, K. N., Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3), 716-723.
- Resendiz-Vazquez, J. A., Ulloa, J. A., Urías-Silvas, J. E., Bautista-Rosales, P. U., Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas-Ulloa, P., González-Torres, L. J. U. S. (2017). Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 436-444.
- Tang, X., Shen, Y., Zhang, Y., Schilling, M. W., Li, Y. (2021). Parallel comparison of functional and physicochemical properties of common pulse proteins. *LWT*, 146, 111594.
- Tontul, İ., Kasimoglu, Z., Asik, S., Atbakan, T., Topuz, A. (2018). Functional properties of chickpea protein isolates dried by refractance window drying. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1253-1259.
- Wang, C. H., Damodaran, S. (1991). Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 433-438.
- Wang, J., Li, Y., Li, A., Liu, R. H., Gao, X., Li, D., ... Xue, Z. (2021). Nutritional constituent and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *Food Research International*, 150, 110790.
- Wang, J., Zhou, X., Li, J., Pan, D., Du, L. (2024). Enhancing the functionalities of chickpea protein isolate through a combined strategy with pH-shifting and cold plasma treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 103607.
- Wang, Q., Jin, Y., Xiong, Y. L. (2018). Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(41), 10827-10834.
- Wang, Y., Wang, S., Li, R., Wang, Y., Xiang, Q., Li, K., Bai, Y. (2022). Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 124, 107351.
- Wang, Y., Yang, F., Wu, M., Li, J., Bai, Y., Xu, W., Qiu, S. (2020). Synergistic effect of pH shifting and mild heating in improving heat induced gel properties of peanut protein isolate. *LWT*, 131, 109812.
- Xiong, T., Xiong, W., Ge, M., Xia, J., Li, B., Chen, Y. (2018). Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate. *Food Research International*, 109, 260-267.
- Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Ruan, S., Wang, Y., ... Ma, H. (2017). Effects of ultrasound pretreatment with different frequencies and working modes on the enzymolysis and the structure characterization of rice protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 19-28.
- Yildiz, G., Andrade, J., Engeseth, N.C., Feng, H. (2017). Functionalizing soy protein nano-

aggregates with pH-shifting and mano-thermosonication. *Journal of Colloid and Interface Science*, 505, 836-846.

Zhang, L., Pan, Z., Shen, K., Cai, X., Zheng, B., Miao, S. (2018). Influence of ultrasound-assisted alkali treatment on the structural properties and functionalities of rice protein. *Journal of Cereal Science*, 79, 204-209.

Zhang, Y., Wang, B., Zhang, W., Xu, W., Hu, Z. (2019). Effects and mechanism of dilute acid

soaking with ultrasound pretreatment on rice bran protein extraction. *Journal of Cereal Science*, 87, 318-324.

Zhao, C., Chu, Z., Miao, Z., Liu, J., Liu, J., Xu, X., ... Yan, J. (2021). Ultrasound heat treatment effects on structure and acid-induced cold set gel properties of soybean protein isolate. *Food Bioscience*, 39, 100827.



## INVESTIGATION OF CONVENTIONAL AND MICROWAVE COMBINED ROASTING EFFECT ON THE PHYSICOCHEMICAL, TEXTURAL AND SENSORY PROPERTIES OF SUNFLOWER SEED

**Ahsen RAYMAN ERGÜN\***

Food Engineering Department, Ege University, İzmir, Türkiye

Received /Geliş: 07.07.2024; Accepted/Kabul: 20.09.2024; Published online/Online baskı: 25.09.2024

Rayman Ergün, A. (2024). Investigation of conventional and microwave combined roasting effect on the physicochemical, textural and sensory properties of sunflower seed. GIDA (2024) 49 (5) 891-902 doi: 10.15237/gida.GD24066

Rayman Ergün, A. (2024). Ayçekirdeğinin fizikokimyasal, tekstürel ve duyuşal özellikleri üzerine konvansiyonel ve mikrodalga kombine kavurma etkisinin incelenmesi. GIDA (2024) 49 (5) 891-902 doi: 10.15237/gida.GD24066

### ABSTRACT

In this study, conventional, microwave, and also a combination of these two methods were applied to compare the quality properties of sunflower seeds. Alternative to conventional roasting at 160°C, microwave roasting at two different powers (300W and 600W) and also microwave with conventional roasting treatment (300 W+160°C, 600 W+160°C) were applied to raw sunflower seeds during 5 and 10 min. for each group. The moisture content of roasted seeds was found to be lower than 6%. The results show that the highest protein and fat content were found in the group of combined methods as 21.09±6.64 and 40.55±0.345% respectively. Additionally, the color values were found to be higher, and hardness and sensory characteristics were protected better after roasting compared to the control (unroasted) group. Roasting of microwave at 600W power for 5 min at 160°C was found to be advantageous for the roasting process of sunflower seed via these properties.

**Keywords:** Hardness, microwave roasting, quality, roasting, sunflower seed

## AYÇEKİRDEĞİNİN FİZİKOKİMYASAL, TEKSTÜREL VE DUYUSAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE KONVANSİYONEL VE MİKRODALGA KOMBİNE KAVURMA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

### ÖZ

Bu çalışmada ayçiçeği tohumlarının kalite özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla konvansiyonel, mikrodalga ve bu iki yöntemin kombinasyonu uygulanmıştır. Ayçekirdekleri 160°C'de geleneksel kavurmaya alternatif olarak iki farklı güçte (300W ve 600W) mikrodalgada kavurma ve ayrıca geleneksel kavurma işlemiyle (300 geleneksel kavurma işlemiyle (300 W+160°C, 600 W+160°C) mikrodalgada her grup için 5 ve 10 dk uygulanmıştır. Kavurulmuş tohumların nem içeriği % 6'dan düşük bulunmuştur. Sonuçlar, en yüksek protein ve yağ içeriğinin sırasıyla %21.09±6.64 ve %40.55±0.345 ile kombine yöntem grubunda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca kavurma sonrasında renk değerlerinin kontrol (kavrulmamış) grubuna göre daha yüksek olduğu, sertlik ve duyuşal özelliklerin daha iyi korunduğu belirlenmiştir. Bu özellikleri nedeniyle ayçiçeği çekirdeğinin kavurma işleminde 600W gücündeki mikrodalga fırında 160°C'de 5 dakika kavurmanın avantajlı olduğu bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Sertlik, mikrodalga kavurma, kalite, kavurma, ayçekirdeği

\* Corresponding author / Sorumlu yazar

✉: ahsenrayman@hotmail.com

☎: (+90) 232 311 3042

☎: (+90) 232 342 7592

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

## INTRODUCTION

Sunflower (*Helianthus annuus L.*) is one of the main crops in the world (Kaya et al. 2012; Seilar and Jan 2010). On a worldwide scale, the sunflower crop is ranked the fourth most important oilseed crops, following soybeans, rapeseed and safflower, as the most economically significant oilseed crop (Adeleke and Babalola, 2020). Also it is largely consumed as confectionery type product and variety of pies and cakes (Jie et al. 2023; Özcan et al. 2024). Sunflower seeds supply several components including unsaturated fats, protein, polyphenols (Guo et al. 2020). Furthermore, sunflower seeds contain high amounts of vitamins and minerals such as vitamins B and E, folate, niacin, phosphorous, sodium, zinc, calcium, iron, magnesium, copper and manganese (Adeleke and Babalola 2020). This high nutritional quality makes it a suitable option for a healthy diet. It is known that it has antioxidant, anti-inflammatory, antihypertensive, antidiabetic and antimicrobial properties (Paji et al. 2011; Guo et al. 2017). It is reported that nutritional profiles provide anti-inflammatory effects against certain chronic diseases (Khan et al. 2015; Al-Kuraieef, 2021).

Roasting is a time-temperature-dependent method for food processing used to cook the product with dry heat (Clarke 1987; Das et al. 2023). It uses the heating principle to cook the food uniformly and improve the sensory qualities, palatability, and digestibility while modifying the matrix of food and desired structural characteristics (Sruthi 2021). Roasting is used and preferred as a pretreatment method before milling of plant seeds commonly and also a good way to prepare the seeds for snacks or long-term storage. (Guo et al. 2020). The aim of this process is to enhance the preferability of this product by changing color, texture, flavor and favorableness. Maillard reaction (non-enzymatic browning) can provide these positive changes (Soleimanieh et al. 2015; Nikzadeh and Sedagha 2008; Robertson et al. 1985). Roasting can greatly enhance flavor by causing the Maillard reaction and caramelization on the food product's surface. The need for fortified roasted products is growing, and worries about food safety have sparked interest in innovative roasting processes as a

potential replacement for traditional methods. For instance, microwave roasting provides more efficiency in terms of energy and time and also preferred products rather than hot-air roasting due to volumetric heating mechanism (Yin et al. 2023). The impact of microwave energy on the nutrients of the food also differs significantly from conventional method due to the mechanism of direct microwave-material interaction which differs from conventional heating that needs heat from the outer heat sources (Yoshida et al. 2001). During microwave roasting with the effect of penetration of microwaves directly inside of the seeds, the process is intensified throughout the core of the material (Nebesny and Budryn 2006; Bölek and Özdemir 2017). Microwaves often used for roasting of plant seeds and researchers obtain non-negligible results. For example Jogihalli et al. (2017) studied with chickpea seed, Bolek and Özdemir, (2017) studied roasting of *Pistacia terebinthus* beans, hazelnut was studied by Uysal et al. (2009), sesame seed was evaluated by Yin et al. (2023) and Ahmed et al. (2023), Raigar et al. (2017) used microwave roasting for peanuts, and Hojjati et al. (2015) measured the impact on pistachios.

Sunflower seed was roasted with microwave technology by several researchers (Yoshida et al. 2001; Goszkiewicz et al. 2020; Soleimanieh et al. 2015; Anjum et al. 2006; Mohammed et al. 2017; Shorstkii et al. 2019; Guo et al. 2019; Mosayebi et al. 2018), but in most of these studies the methods compared separately and characteristics of sunflower oils were examined. Additionally there is no study in the literature using the conventional and microwave roasting method together.

Therefore in this study, it was aimed to investigate the synergistic effects of conventional and microwave roasting methods and to compare them with the methods individually applied in terms of some quality characteristics of sunflower seed. The physicochemical (moisture, protein, fat, ash), textural (hardness), sensorial (color, texture, odor, general appeal) and color ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) values were determined at two different microwave powers (300 and 600W) and times (5 and 10 min.).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Raw sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) were purchased from a local producer in İzmir Turkey. The initial moisture content of unroasted seed was determined as  $9.32 \pm 0.83\%$  (wet basis). All chemicals used in this study were analytical grade and from either Merck (Darmstadt, Germany) or Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland).

### Methods

Before roasting samples were cleaned and deshelled. Then, they were kept at 4°C until using in experiment. Three different roasting methods (conventional roasting, microwave roasting, and microwave roasting+conventional roasting) were carried with an oven (ArclikKMF 833, Istanbul, Turkey) which can be used as both conventional and microwave at the same time. Samples (50 g each) were subjected to conventional roasting treatment for 5 and 10 min at 160 °C; to microwave roasting treatment for 5 and 10 min at 300 and 600 W; and to microwave roasting + conventional roasting treatment for 5 and 10 min at 300 W + 160 °C, and 600 W + 160 °C, respectively. Samples groups were coded as 1 :160 °C, 5 min, conventional roasting, 2: 160 °C, 10 min, conventional roasting, 3: 300 W, 5 min, microwave roasting, 4: 300 W, 10 min, microwave roasting, 5: 600 W, 5 min, microwave roasting, 6: 600 W, 10 min, microwave roasting, 7: 300 W, 160 °C, 5 min, microwave roasting+conventional roasting, 8: 300 W, 160 °C, 10 min, microwave roasting+conventional roasting, 9: 300 W, 160 °C, 5 min, microwave roasting+conventional roasting, 10:600 W, 160 °C, 10 min, microwave roasting+conventional roasting. Production was done in 2 repetitions and analysis in 3 parallels.

Roasting conditions were determined according to literature and also pretreatments taking into account the burning of samples above the selected temperature, time and microwave power (Anjum et al. 2006; Darvishi et al. 2013).

### Chemical Characteristics

#### *Composition of sunflower seeds*

Moisture, protein, fat and ash contents of samples were measured according to AACC (2000).

### Color value

Konica Minolta Chroma Meter (CR-400, Japonya) was used to measure the colour values of the samples. Calibration of the tool was made with standard white line ( $Y = 93.9$ ,  $x = 0.313$ ,  $y = 0.321$ ) for the values of  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (redness/greenness), and  $b^*$  (yellowness/blueness). Also total color differences ( $\Delta E$ ) of the treatment groups were calculated based on the values of control group given in the Equation 1.

$$\Delta E = \sqrt{[(L^* - L^*_{ref})^2 + (a^* - a^*_{ref})^2 + (b^* - b^*_{ref})^2]} \quad (\text{Eq. 1})$$

### Texture Analysis

Hardness is an important charactersitic and defined as the required force over compression test. TA.XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro System Co. Ltd., Surrey, UK) with a load cell of 250 N. The diameter of 32 mm, a speed of 5 mm/min, and a penetration index of the (P/36R) probe 50% of the thickness (Mosayabi et al. 2018; Soleimanieh et al. 2015) was used for textural analysis of the sunflower seeds. 10 sunflower seeds were used for measurements.

### Sensory analysis

8 trained panelists for the 10 different samples performed the sensory tests. Panelists put in order their liking of the samples for color, texture, odor and general appeal in a 10-point hedonic scale ranging from 1 (dislike extremely) to 10 (like extremely). The mean values and standart deviations were calculated (Altuğ and Elmacı, 2005).

### Statistical analysis

Data obtained from the research were analyzed with the Duncan test, One-way ANOVA technique in statistical software (Version 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) at a least significant difference of  $P\text{-value} \leq 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Evaluation of Proximate Composition

Moisture, protein, fat and ash contents of control and roasted samples were given in the Table 1.



Moisture content was found as  $4.18 \pm 0.01$  % in the control group. In the conventional roasted samples, time significantly effected the moisture content ( $P \leq 0.05$ ). The minimum moisture ratio was found to be as  $2.11 \pm 0.08$  in the 300 W, 160 °C and 10 min. group. Also the power of microwave was found statistically significant on the moistures ( $P \leq 0.05$ ). The decreases were seen in moisture contents due to increase in roasting time and power of microwave. Mohammed et al. (2017), confirmed that the moisture content of the unroasted sunflower seed was 5.69 %. In

another study, seeds of sunflower were processed with microwaves for 6, 12, 20 or 30 min at a frequency of 2450 MHz., and it was found the roasting time was parallel to the rate of the weight loss of the seeds at the end of roasting (Yoshida et al. 2001). In accordance with these results, Ahmed et al. (2020), also indicated that microwave roasting significantly decreased the moisture content of sesame seeds due to the water evaporation from the seeds by the generated heat and supported this condition by similar studies.

Table 1. Proximate Composition of Control and Roasted Sunflower Seed Samples

Sample	Power (W)	Temperature (°C)	Time (min.)	Moisture (% w.b.)	Protein (%)	Fat (%)	Ash (%)
Control	-	-	-	$4.18 \pm 0.01^{a,b}$	$17.60 \pm 0.01^{a,b}$	$36.33 \pm 0.35^a$	$3.14 \pm 0.01^a$
1	-	160	5	$4.30 \pm 0.07^a$	$10.66 \pm 2.21^d$	$35.52 \pm 0.423^b$	$2.81 \pm 0.02^b$
2	-	160	10	$3.55 \pm 0.03^d$	$15.36 \pm 5.66^{b,c}$	$36.43 \pm 0.444^{b,c}$	$2.88 \pm 0.07^b$
	300	-	5	$3.19 \pm 0.04^d$	$10.95 \pm 1.71^{c,d}$	$35.12 \pm 0.330^{b,c}$	$2.83 \pm 0.11^b$
4	300	-	10	$2.97 \pm 0.99^{e,f}$	$14.01 \pm 1.69^{b,c}$	$38.25 \pm 0.420^c$	$2.80 \pm 0.04^b$
5	600	-	5	$3.68 \pm 0.23^{c,d}$	$12.71 \pm 1.51^{b,c,d}$	$37.52 \pm 0.300^c$	$2.80 \pm 0.07^b$
6	600	-	10	$2.93 \pm 0.05^{e,f}$	$13.86 \pm 1.64^{b,c,d}$	$37.33 \pm 0.350^c$	$2.87 \pm 0.01^b$
7	300	160	5	$3.28 \pm 0.05^{d,e}$	$12.84 \pm 1.73^{b,c,d}$	$36.49 \pm 0.314^b$	$2.82 \pm 0.01^b$
8	300	160	10	$2.11 \pm 0.08^g$	$12.87 \pm 0.89^{b,c,d}$	$39.33 \pm 0.327^d$	$2.91 \pm 0.21^b$
9	600	160	5	$2.68 \pm 0.02^f$	$21.09 \pm 6.64^a$	$40.55 \pm 0.345^d$	$2.76 \pm 0.05^b$
10	600	160	10	$2.92 \pm 0.14^{e,f}$	$18.43 \pm 1.56^{a,b}$	$41.40 \pm 0.296^d$	$2.86 \pm 0.03^b$

<sup>a-c</sup> Means in the same column with different superscripts are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

Protein content was determined in the control (unroasted seed) sample as 17.60% .whereas the highest protein content was found in the combined group of 600W- 5min-160°C. The lowest value of protein was found in the group of conventional roasting 160°C- 5 min. as  $10.66 \pm 2.21$ . The microwave power also found to be significant at a stable time and temperature ( $P \leq 0.05$ ). Mohammed et al. (2017), determined the protein content of unroasted sunflower seeds as 24.2%. They also found that roasting by microwave was not effective on the fiber, ash, and protein contents of seeds significantly ( $P \leq 0.05$ ).

There is a disagreement between the previous researchers. Some of researches showed that application of roasting did not effect the protein content and amino acid composition of sunflower

seed, although the concentration of lysine was found higher in raw rather than in roasted samples (Sarrazin et al. 2003). They also expressed that glutamic acid was the most dominant amino acid in sunflower seed, followed by aspartate and arginine. In contrast to this, Lao et al. (2023) studied the pre-roasting of yellow pea proteins and found that other studies suggest that roasting under moderate conditions has a positive effect on protein solubility and emulsification. They also noted that higher temperatures (150°C) and longer roasting times (10, 20, and 30 minutes) could potentially alter the protein structures and consequently affect the protein content. Inversely, Ji et al. (2023), determined that better quality sunflower seed oil was obtained when roasted at 160- 180°C for about 20 min (e.g., 160°C for 20–25 min or 180°C for 15–20 min).

But they found after roasting at 160, 180 and 200°C for 25 min, the total amount of amino acids decreased to 49.09, 47.51, and 40.86%, respectively. Among the 17 amino acids detected, cysteine, lysine, arginine, and serine decreased more significantly than others.

Fat content was found to be as 36.33±0.35 in the unroasted samples whereas in the combined groups this value increases to 39.33-41.40%. The effect of methods was found to be significant on the fat contents of seeds ( $P \leq 0.05$ ). In the other researches it was claimed that roasting slightly effected fatty acid profiles of sunflower seeds e.g. in a previous study, they designated that fatty acid concentrations of sunflower seeds did not change which was autoclaved at 127°C for up to 30 min. (Sarrazin et al. 2003). Jie et al. (2023), specified that seed roasting has been widely used to improve oil recovery and oxidative stability, coagulate proteins, and most importantly to impart special flavor and aromas to oils through the Maillard reaction.

Ash content was not changed significantly via the roasting method ( $P > 0.05$ ). The ash amounts were found between 2.76-2.91%. Ash values of the samples increased parallel with the time when the power was constant but this increase was not

found statistically significant ( $P > 0.05$ ). Accordingly, Ahmed et al. (2020), exclaimed that roasting effect on ash content was not statistically significant in sesame seeds.

**Evaluation of color**

In roasted products color is an important quality characteristic and showed by quantitative data as  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  (Mosayebi et al. 2018). These parameters were measured and showed in the Table 2. Also total color difference ( $\Delta E$ ) were given in the same table.  $L^*$  (brightness) value was found as 79.00±0.59 in the control group and the change was found statistically significant when compared to the combination groups ( $P \leq 0.05$ ). In a combination group (300W, 160°C, 5 min.),  $L^*$  has the highest value as 77.47±0.57.  $a^*$  value found at most in the 600W, 160°C 5 min. group. Redness value was important for the roasted samples.  $b^*$  value was found most in the 300 W, 160°C, 10 min as 23.97±1.24. Time affected significantly the color of the samples at a constant power level ( $P \leq 0.05$ ). The color parameters increased parallel with the increase in time. Also, total color differences showed that both treatments were statistically significant effect on the color values ( $P \leq 0.05$ ). The results showed that, combination groups changed the color values positively.

Table 2. Color Values and Hardness of Control and Roasted Sunflower Seeds

Sample	Power (W)	Temperature (°C)	Time (min.)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$\Delta E$	Hardness (g)
Control	-	-	-	79.00±0.59 <sup>a</sup>	2.50±0.30 <sup>a</sup>	20.20±0.48 <sup>a</sup>		13657.36±7853.71 <sup>a</sup>
1	-	160	5	78.42±0.69 <sup>a,b</sup>	1.50±0.24 <sup>c</sup>	17.30±0.82 <sup>c</sup>	2.84±0.02 <sup>a</sup>	6972.14±7124.50 <sup>b</sup>
2	-	160	10	78.47±0.42 <sup>a</sup>	1.54±0.21 <sup>c</sup>	17.58±0.62 <sup>d,e</sup>	2.96±0.10 <sup>a</sup>	7472.14±8024.50 <sup>c</sup>
3	300	-	5	77.99±0.69 <sup>a,b,c</sup>	1.80±0.21 <sup>c</sup>	17.63±0.50 <sup>d,e</sup>	2.42±0.03 <sup>a</sup>	9380.84±4806.81 <sup>a</sup>
4	300	-	10	77.91±1.54 <sup>a,b,c</sup>	1.63±0.53 <sup>c</sup>	18.15±2.26 <sup>d,e</sup>	2.52±0.02 <sup>a</sup>	7691.45±6618.66 <sup>c</sup>
5	600	-	5	77.54±0.77 <sup>b,c</sup>	1.70±0.25 <sup>c</sup>	18.34±0.96 <sup>d</sup>	2.43±0.00 <sup>a</sup>	6670.93±7844.52 <sup>b</sup>
6	600	-	10	77.43±0.95 <sup>c</sup>	1.71±0.41 <sup>c</sup>	18.52±0.89 <sup>c</sup>	1.93±0.04 <sup>a</sup>	9840.33±7116.31 <sup>a</sup>
7	300	160	5	77.47±0.57 <sup>c</sup>	1.56±0.28 <sup>c</sup>	19.56±0.62 <sup>d</sup>	6.92±0.03 <sup>a</sup>	4966.77±3568.27 <sup>d</sup>
8	300	160	10	73.20±1.15 <sup>f</sup>	2.60±0.33 <sup>b</sup>	23.97±1.24 <sup>a</sup>	5.04±0.02 <sup>a</sup>	4457.01±4238.66 <sup>d</sup>
9	600	160	5	74.02±1.39 <sup>e</sup>	3.11±0.48 <sup>a</sup>	20.68±0.57 <sup>b</sup>	3.90±0.00 <sup>a</sup>	5791.45±6015.56 <sup>d</sup>
10	600	160	10	75.21±1.30 <sup>d</sup>	2.42±0.48 <sup>b</sup>	21.11±1.29 <sup>b</sup>	2.96±0.10 <sup>a</sup>	6847.94±4723.96 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Means in the same coloumn with different superscripts are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

In another study the sufflower was roasted at 180°C for 15 min. After Maillard reaction the color of the products was increased (Taha and Matthäus 2018). Some quality criterias such as

color, total phenolic contents of the oil, and the antioxidant activity of seeds oil influenced by higher temperatures (Taha and Matthäus 2018). Similarly in microwave roasting of chickpea

lightness decreased while  $a^*$  and  $b^*$  value increased with roasting (Jogihalli et al. 2017). Additionally, Mohammed et al. (2017), roasted sunflower seeds at 700 MHz at 130°C in microwave oven and found the  $a^*$  value between 1.1 and 1.6 during 8 to 20 min roasting respectively.

Hojjati et al. (2015), roasted the pistachios and found the  $L^*$  value as 57.32 and 57.68 for 640 and 480 W during 4 min. respectively whereas the hot air roasting samples had this value as 54.51. The raw material has  $L^*$  value of 61.88. They also added that generally, when the roasting time increased at a constant MW power, a decrease in the  $L^*$  values of nuts was observed. Nevertheless, the power of MW did not significantly effect lightness compared to control group ( $P>0.05$ ). Pistachios became darker due to browning, when the MW roasting time and power increased the  $a^*$  values also increased; but also they concluded that the differences were not bigger than 2 units, so this could not create a problem for the consumers. They also determined that  $b^*$  value did not effected by MW time and power.

### Evaluation of texture

Hardness is the measure of a material's resistance to deformation or collapse. In the context of food, hardness typically refers to the force required to break the material, often felt during the initial bite with the molars. Control sample had the hardness value of  $13657.36 \pm 7853.71$  (g). Hardness values differed significantly between the combined group and the other groups ( $P \leq 0.05$ ). In the group of 300 W-5 min hardness was found as 9380 (g) and in the 600 W-10 min treatments as 9380 (g) which were not statistically significant from the control group ( $P > 0.05$ ). Minimum hardness value was determined as 4457.01 (g) in the 600 W-160°C-10 min. In this study, it was observed that breaking force decreased with the microwave technology and also increase in roasting time and power, the samples became softer when compared with the unroasted one. As previously mentioned in a different study, The breaking force of *P. terebinthus* beans was adversely affected from the roasting power and roasting time increasing (Bölek and Özdemir 2017). In another study, maximum hardness of

roasted sunflower seed was 1962 NS in treatment of 401 W, 121°C, 3.6 min. and minimum value was 256.9 NS in treatment of 401 W, 158°C, 3.6 min. During the roasting process at high temperatures, the decrease in moisture content of the kernels led to them becoming crispier and more fragile, requiring less force to break. Consequently, the hardness decreased (Mosayebi et al. 2018).

Similar to our study, time increase significantly effect the hardness value but not parallel with the increase in time or power. They investigated the effect of both methods of microwave and convection in sunflower seeds and used the temperature of 180°C for 5, 15, 20 and 25 min. The other groups were exposed to microwave radiation for 4, 6, and 8 minutes at microwave powers of 500, 600, and 800 W. The hardness value was found to be  $22165.42 \pm 3173.61$  (g) in the control group and  $21164.47 \pm 2433.15$  (g) in the 5-minute group during conventional roasting. While in MW roasting hardness was found to be as  $21572.76 \pm 1324.88$  (g) in 500 W – 4 min;  $19689.76 \pm 1732.59$  (g) in 500 W 6 min. group, and as  $20226.33 \pm 2012.56$  (g) in the group of 500 W 8 min. In the 600W group at 4 min. this value was  $21097.56 \pm 1533.23$  (g); for 6 min. as  $21574.66 \pm 2246.01$  (g); and for 8 min as  $19670.44 \pm 1295.45$  (g) (Goszkiewicz et al. 2020).

In an earlier research investigation, the firmness of roasted sunflower seeds fell between 28.31 and 55.83 Newtons (N) (Costell et al. 2010; Joyner, 2019). Yin et al. (2023) conducted a study on sesame seeds and found that the judicious use of microwave technology offered distinct benefits compared to traditional hot-air roasting. They observed a significant improvement in the extraction rate of sesame seeds following microwave treatment, attributed to the enhanced porosity and disruption of cell structure within the seeds. So it can be effective on the texture (hardness) of tissues. Similar results were observed for roasted peanuts, where it was shown that hardness exhibited a linear relationship with both roasting time and microwave (MW) power. Additionally, the quadratic effect of MW power significantly impacted the hardness of the

samples. The hardness of peanuts tended to decrease with increasing roasting time and MW power, attributed to the rise in brittleness resulting from moisture loss. This phenomenon suggests a slightly softer and crisper texture in the roasted peanuts (Kahyaoglu and Kaya, 2006). The ideal hardness for peanuts was achieved at 4528.34 grams, with a roasting time of 201.17 seconds and a microwave (MW) power of 898.57 watts, according to Raigar et al. (2017).

**Evaluation of sensory analysis**

Color, texture, odor and general appeal of roasted sunflower seeds scored by panelists (Table 3). The

impact of various roasting conditions on the sensory evaluation of both control and roasted sunflower seeds is illustrated in Figure 1. There was a significant difference between the scores of panelists to color values of combination groups between the other groups ( $P \leq 0.05$ ). Texture, odor and general appeal scores were decreased in the combined groups compared to the conventional and microwave roasting methods when they separately applied. However, these decreases not showed statistically significant effects between the groups ( $P > 0.05$ ).

Table 3. Sensorial Analysis of Control and Roasted Sunflower Seeds

Sample	Power (W)	Temperature (°C)	Time (min)	Color	Texture	Odor	General Appeal
Control	-	-	-	8.25±0.86 <sup>a</sup>	7.37±1.63 <sup>a</sup>	8.00±1.03 <sup>a</sup>	8.00±0.73 <sup>a</sup>
1	-	160	5	8.00±1.03 <sup>a,b</sup>	7.00±1.59 <sup>a</sup>	7.37±1.15 <sup>a,b</sup>	7.56±1.03 <sup>a,b</sup>
2	-	160	10	6.81±1.68 <sup>b,c</sup>	6.62±2.22 <sup>a,b,c</sup>	7.06±1.29 <sup>a,b,c</sup>	6.94±1.29 <sup>a,b,c</sup>
3	300	-	5	7.37±1.36 <sup>a,b,c</sup>	6.75±1.84 <sup>a,b</sup>	6.56±1.67 <sup>b,c,d,e</sup>	6.81±1.17 <sup>b,c</sup>
4	300	-	10	7.44±1.03 <sup>a,b,c</sup>	6.62±2.28 <sup>a,b,c</sup>	6.69±1.14 <sup>b,c,d,e</sup>	6.75±1.29 <sup>b,c</sup>
5	600	-	5	7.56±1.46 <sup>a,b,c</sup>	5.75±2.86 <sup>a,b,c</sup>	6.69±1.40 <sup>b,c,d,e</sup>	6.50±1.41 <sup>b,c</sup>
6	600	-	10	6.56±2.30 <sup>c,d</sup>	7.19±1.33 <sup>a</sup>	6.75±1.44 <sup>b,c,d</sup>	6.50±1.63 <sup>b,c</sup>
7	300	160	5	6.94±1.61 <sup>b,c</sup>	7.44±1.46 <sup>a</sup>	6.56±2.10 <sup>b,c,d,e</sup>	6.69±2.33 <sup>b,c</sup>
8	300	160	10	5.56±1.75 <sup>d</sup>	6.06±1.88 <sup>a,b,c</sup>	5.75±1.77 <sup>d,e</sup>	5.81±1.33 <sup>c</sup>
9	600	160	5	6.81±1.80 <sup>b,c</sup>	5.06±2.52 <sup>c</sup>	5.81±1.64 <sup>c,d,e</sup>	5.81±1.51 <sup>c</sup>
10	600	160	10	6.31±1.92 <sup>c,d</sup>	5.12±2.45 <sup>b,c</sup>	5.44±2.22 <sup>c</sup>	5.75±1.80 <sup>c</sup>

<sup>a-e</sup> Means in the same coloumn with different superscripts are significantly different ( $P \leq 0.05$ ).

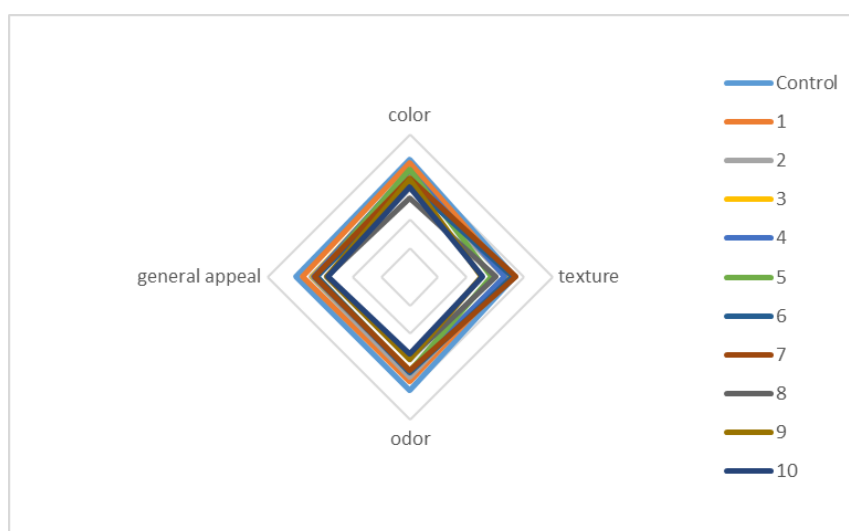


Fig 1. Effects of different roasting conditions on the sensory analysis of control and roasted sunflower seeds.

In line with these findings, Goszkiewicz et al. (2020) discovered that conventional roasting notably enhanced the aromas and flavors of seeds. However, they did not observe significant differences in consumer preference between microwave and conventional treatment methods. Goszkiewicz et al. (2020) further noted that the assessment of unroasted, microwave, and conventionally roasted samples demonstrated a heightened intensity of aroma and taste with convective roasting. However, microwave roasting did not compromise the sensory quality of the product, as evidenced by overall consumer preference. Additionally, the utilization of convection roasting was found to increase the textural hardness value.

The earlier researchers also elucidated that texture parameters exhibited a positive correlation with sensorial hardness and a negative correlation with total acceptance. Hence, it can be inferred that lower textural values corresponded to higher consumer acceptance scores and overall acceptability. From the consumers' perspective, the samples garnered moderate total acceptance. This observation may be attributed to the novel color and flavor profiles of the samples (Mohammadi-Moghadda, 2021). In agreement to these results in this study also it can be said that it is very difficult to choose the newly processed food product instead of the usual consumed ones, so it is normal to be that the scores was not significantly changed ( $P>0.05$ ).

The sensory evaluation of roasted sunflower seeds revealed a moderate level of overall acceptance among consumers, potentially attributed to the novel color and flavor profiles of the samples. Goszkiewicz et al. (2020) observed that the aroma and taste of sunflower seeds roasted using the conventional method were predominantly preferred, hypothesizing that this preference might stem from the higher convection roasting temperature, with the sample temperature averaging at 75°C post-roasting. Importantly, the roasting methods employed did not have adverse effects on the structure of the sunflower seeds. These findings align with the results of studies by Mosayebi et al. (2018) and

Soleimanieh et al. (2015), which indicated a decrease in moisture content of the seeds and an associated increase in crispiness.

Laemont and Sheryl Barringer (2023) noted that unlike other nuts such as peanuts, roasted sunflower seeds lack a standard color. However, consumers are able to discern the difference between the aromas of roasted and unroasted sunflower seeds by the end of sensory analysis. Another researcher emphasized that roasting parameters, particularly time and temperature, are crucial for the formation of contaminants, as they significantly influence the concentration of compounds such as furan (Silva da Costa et al. 2023). In a separate study by Hojjati et al. (2015), the highest scores for volatile concentration and sensory odor intensity scores were determined in hot air roasted pistachios and microwaved pistachios at 640 watts for 4 minutes.

In a prior study, it was clearly demonstrated through Spider's web plots that microwave roasting for 8 minutes led to enhanced aroma in roasted kernels compared to samples roasted for 4 and 6 minutes. They also decided that the scores decrease when the microwave power and the time decreased. Furthermore, MW power of 600 W and roasting time of 6 min gave the best result in the sensory test. As a result, samples treated with high power for longer periods received scores significantly below the average. In our study, the panelists observed that after roasting process the seeds were generally liked but the scores significantly different compared to the control unroasted ones, while it can be thought that the type of roasting method did not significantly affect the sensorial characteristics ( $P>0.05$ ). According to this study, the expert panel did not detect any significant changes in the texture of sunflower seeds after roasting, whereas raw seeds were evaluated as firmer. Additionally, in another study, seeds roasted in an electric oven received higher overall acceptability scores compared to seeds roasted in a microwave oven (Biosci et al., 2015; Mosayebi et al., 2018). Another work selected 900 W for 6 min. as the optimum for the MW process of sesame seeds because the most preferred sensory quality was found in this group. Indeed, excessive microwave pretreatment (at 900

W for 10 minutes) resulted in a further decrease in aroma-active heterocyclics and  $\gamma$ -tocopherol, while increasing the perception of undesirable sensory attributes such as a strong bitter taste and burnt flavor (Yin et al., 2023). It's worth noting that the acceptance of food is influenced by various factors including its sensory properties, consumer expectations, cultural background, physiological state (such as hunger, thirst, or illness), and many other factors. (Costell et al. 2010; Joyner, 2019).

### CONCLUSION

Sunflower seeds are not only nutritionally beneficial but also highly favored by consumers. They are commonly incorporated into food mixes, multi-grain bread, and bars, which are particularly beloved choices among consumers. Microwave-assisted dry roasting of seeds offers several distinct advantages. The intense heat is generated directly within the food material, thanks to the uniform penetration and distribution of microwave radiation upon exposure. Results were evaluated and microwave+conventional roasted samples generally gave better results compared to individual treatments of microwave and conventional roasted samples. 300 W, 160°C, 10 min and 600W, 160°C, 5 min combined application groups had the highest color ( $a^*$  and  $b^*$ ) values. Protein and fat contents also found higher in the 600 W, 160°C, 10 min and 5 min groups. Sensorial test indicated that, consumers can prefer the roasted sunflower seeds with more tender texture. The combined effect of microwave (MW) and conventional roasting on seeds has a profound impact on their physicochemical characteristics. This study provided insights on the quality changes of roasted sunflower seeds using different techniques together. In further researches, optimizing parameters for different type of plant seeds and also the effects on the shelf life can be examined.

### DECLARATION OF COMPETING INTEREST

There is no conflict of interest.

### FUNDING

No funding sources

### REFERENCES

- AACC. Approved Methods of the AACC. 10th Edition.(2000). American Association of Cereal Chemists, St. Paul.
- Adeleke B.S., Babalola O.O. (2020). Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits. *Food Science & Nutrition*. 8(9):4666-84. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1783>
- Al-Kuarieef A. N. (2021). Study on the effect of incorporation of irradiated sunflower flour on the physico-chemical and sensory properties of biscuits during the storage period. *Food Research*. 5(2):191 – 200.[https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(2\).359](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(2).359)
- Altuğ, T., Elmacı, Y. (2005). *Gıdalarıda dnyusal değerlendirme*. Meta Basım, İzmir, s.130.
- Anjum, F., Anwar, F., Jamil, A., Iqbal, M. (2006). Microwave roasting effects on the physico-chemical composition and oxidative stability of sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 83(9):777-784.
- Bölek, S., Özdemir, M. (2017). Optimization of roasting conditions of microwave roasted Pistacia terebinthus beans. *LWT-Food Science And Technology*. 86:327-336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.017>
- Clarke, R.J, (1984). editor. "Coffee: Volume 2: Technology". Essex, UK: Elsevier Science Publishers Ltd..<https://doi.org/10.007/978-94-009-3417-7>
- Da Costa, D.S., Albuquerque T.G., Costa, H.S., Bragotto, A.P.A. (2023). Thermal contaminants in coffee induced by roasting: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 20(8):5586.<https://doi.org/10.3390/ijerph20085586>
- Costell, E., Tárrega, A., Bayarri, S. (2010). Food Acceptance: The Role of Consumer Perception and Attitudes. *Chemosensory Perception*. 3: 42-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s12078-009-9057-1>

- Darvishi, H., Hadi, Khoshtaghaza M, Najafi, G., Zaren, M. (2013). Characteristics of sunflower seed drying and microwave energy consumption. *International Agrophysics*. 27:(2). <https://doi.org/10.2478/v10247-012-0077-8>
- Das P.P., Duarah, P., Purkait, M.K. (2023). *Fundamentals of food roasting process. High-Temperature Processing of Food Products*. Sawston, UK: Woodhead Publishing. pp. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818618-3.00005-7>
- Guo, S., Ge Y., Jom, K.N. (2017). A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common sunflower seed and sprouts (*Helianthus annuus* L.). *Chemistry Central Journal*. 11(1):95. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0328-7>
- Guo, S., J.O.M., K.N., Ge, Y. (2019). Influence of Roasting Condition on Flavor Profile of Sunflower Seeds: A flavoromics approach. *Scientific Reports*. 9, 11295. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47811-3>.
- Guo, S., J.O.M., K.N., Ge, Y. (2020). Effects of storage temperature and time on metabolic and flavouromic profiles of roasted germinated sunflower seeds. *Journal of Food & Nutrition Research*. 59(3):219-32.
- Goszkiewicz, A., Kolodziejczyk, E., Ratajczyk, F. (2020). Comparison of microwave and convection method of roasting sunflower seeds and its effect on sensory quality, texture and physicochemical characteristics. *FoodStructure*. 25:100144. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100144>
- Hojjati, M, Noguera Artiaga, L., Wojdyło, A., Carbonell, B.Á.A. (2015). Effects of microwave roasting on physicochemical properties of pistachios (*Pistacia vera* L.). *Food science and Biotechnology*. 24: 1995-2001. <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0263-0>
- Ji J, Zhang, Y., Wang, Y., Wang, D., Jie, H. (2023). Influence of seed-roasting degree on quality attributes of sunflower oil. *Journal of Food Science*. 88(10):4028-45. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16735>
- Jogihalli, P., Singh, L., Sharanagat, V.S. (2017). Effect of microwave roasting parameters on functional and antioxidant properties of chickpea (*Cicer arietinum*). *LWT-Food Science and Technology*. 79: 223-233. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.047>
- Joyner, H.S. (2019). *Rheology of Semisolid Foods*. Springer. ISBN: 9783030271343.
- Kahyaoğlu, T., Kaya S. (2006). Determination of optimum processing conditions for hot-air roasting of hulled sesame seeds using esponse surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 1452–1459. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2509>.
- Kaya, Y., Jovic, S., Miladinovic, D. (2012). Sunflower. *Technological Innovations in Major World Oil Crops*. 1:85-129. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0356-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0356-2_4)
- Khan, S., Choudhary, S., Pandey, A., Khan, M.K., Thomas, G. (2015). Sunflower oil: Efficient oil source for human consumption. *Emergent Life Sciences Research*. 1:1–3.
- Laemont, J., Barringer, S. (2023). Effect of pH, Reducing Sugars, and Protein on Roasted Sunflower Seed Aroma Volatiles. *Foods*. 12 (22):41-55. <https://doi.org/10.3390/foods12224155>
- Lao, Y., Ye, Q., Wang, Y., Vongsivut, J., Selomulya, C. (2023). Quantifying the effects of pre-roasting on structural and functional properties of yellow pea proteins. *Food Research International*. 172: 113180 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113180>
- Moghaddam M.T., Firoozzare A., Daryadar, S., Rahmani, Z. (2020). Black plum peel jam: physicochemical properties, sensory attributes, and antioxidant capacity. *International Journal of Food Properties*. 23:(1)1737-1747, <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2020.1830798>
- Mohammed, K., Koko M., Obadim, L. K.S., Cao, P, Liu, Y. (2017). Effects of microwave roasting process and time on chemical composition and oxidative stability of sunflower oil. *Journal of Food*

- Nutrition Reserach*. 5:659-667. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-9-5>
- Mohamed, A. I. A., Özcan, M., Uslu, N., Juhaimi, F. A., Osman A.A., Alqah H. A., Ghafoor, K., Babiker, E.E. (2020). Effect of microwave roasting on color, total phenol, antioxidant activity, fatty acid composition, tocopherol, and chemical composition of sesame seed and oils obtained from different countries. *Journal of Food Processing and Preservation*. 44(10):e14807. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14807>
- Mosayebi, M., Kashannejad, M., Najafian, L. (2018). Optimizing physiochemical and sensory properties of infrared-hot air roasted sunflower kernels using response surface methodology. *Journal of Food Quality*. <https://doi.org/10.1155/2018/4186050>
- Nebesny, E., Budryn, G. (2006). Evaluation of sensory attributes of coffee brews from robusta coffee roasted under different conditions. *European Food Research and Technology*. 224:159-165. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0308-y>
- Nikzadeh, V., Sedagha, N. (2008). Physical and Sensory Changes in Pistachio Nuts as Affected by Roasting Temperature and Storage. *Am.-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Sciences*. 4 (4): 478-483.
- Özcan, M.M, Yılmaz, F. G, Uslu, N., Kulluk, D.A., Dursun, N., Yılmaz, H. (2024). Determination of bioactive compounds, phenolic contents, fatty acid and biogenic element profiles of the seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *Food and Humanity*. 2:100222. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.100222>
- Pajin, B., Đimić, E., Romanić, R., Radujko, I. (2011). Influence of fatty acid composition of sunflower kernel on quality and shelflife of cookies. *Acta Alimentaria*. 40(1):71-9. <https://doi.org/10.1556/AAlim.40.2011.1.10>
- Raigar, R.K., Upadhyay, R., Mshra, H.N. (2017). Optimization of microwave roasting of peanuts and evaluation of its physicochemical and sensory attributes. *Journal of Food Science and Technology*. 54:2145-2155. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2654-0>
- Robertson, J.A., Roberts, R.J., Chapman, J.R. J.W. (1985). Changes in Oil Type Sunflower Seed Stored at 20° at Three Moisture Levels. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 62:1335-1339. <https://doi.org/10.1007/BF02545953>
- Sarrazin, P., Mustafa, A.F, Chounard, P.Y., Raghavan, G.S.V., Sotocinal, S.A. (2003). Effects of roasting on ruminal nutrient degradability of sunflower seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83(12):1219-1224. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1529>
- Seiler, G., JAN, C.C. (2010). *Basic information*. In: *Genetics, genomics and breeding of sunflower*. CRC Press. pp. 1-50.
- Shorstkii, I.A, Zherlcin A.G., Li, P. (2019). Impact of pulsed electric field and pulsed microwave treatment on morphological and structural characteristics of sunflower seed. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids* 26:47. <https://doi.org/10.1051/ocl/2019048>.
- Solemanieh S.M., Eshaghi, M., Vanak, Z. P. (2015). The effect of roasting method and conditions on physic chemicals and sensory properties of sunflower seed kernels. *International Journal of Biosciences*. 6(7):7-17. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/6.7.7-17>
- Sruthi, N., Premjit, Y., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Ramesh, S.V. (2021). An overview of conventional and emerging techniques of roasting: Effect on food bioactive signatures. *Food Chemistry*. 348:129088. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129088>.
- Taha, E., Matthäus, B. (2018). Effect of roasting temperature on safflower seeds and oil. *Journal of Food and Dairy Sciences*. 9(3):103-109. <https://doi.org/10.21608/JFDS.2018.35413>
- Uysal, N., Sumnu, G., Sahin, S. (2009). Optimization of microwave-infrared roasting of hazelnut. *Journal of Food Engineering*. 90(2):255-261. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.029>
- Yin, W.T., Yang, C.J., He, X.Y., Zhao, Y.H., Liu, H.M., Zhai, Z.Q. (2023). Comparison of microwave and hot-air roasting on microstructure of sesame seed, aroma-active, hazardous



components, and sensory perception of sesame oil. *Food Chemistry*: X. 2023;20:101045. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101045>

Yoshida, H., Hirakawa, Y., Abe, S. (2001). Roasting influences on molecular species of

triacylglycerols in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). *Food Research International*. 34(7):613-619.

## BEZELYE PROTEİNİ VE SİRULİNA İLAVESİNİN İKİLİ HİDROJEL FORMLARININ REOLOJİK ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Gülce Bedis KAYNARCA\*

Kırklareli Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kırklareli, Türkiye

Geliş/Received: 02.08.2024; Kabul /Accepted: 24.09.2024; Online baskı /Published online: 26.09.2024

Kaynarca, G. B. (2024). Bezelye proteini ve spirulina ilavesinin ikili hidrojel formlarının reolojik özellikleri üzerine etkisi. GIDA (2024) 49 (5) 903-919 doi: 10.15237/ gida.GD24078

Kaynarca, G. B. (2024). The effect of pea protein and spirulina addition on the rheological properties of binary hydrogel forms. GIDA (2024) 49 (5) 903-919 doi: 10.15237/ gida.GD24078

### ÖZ

Bu çalışma, bezelye proteini ve spirulina bazlı pektin-jelatin ikili hidrojellerinin yüksek su içeriği, düşük kalori ve tokluk hissi sağlama avantajları nedeniyle geliştirilmesi ve reolojik özelliklerinin incelenmesi üzerine odaklanmaktadır. Rotasyonel ve salınım testlerine göre kıvam katsayıları, 6P1B örneğinde (%6 pektin-%0.5 jelatin-%1 bezelye proteini) 6P1S örneğine (%6 pektin-%0.5 jelatin-%1 spirulina) göre sırasıyla %25 ve %20 daha yüksek bulunmuştur. Örneklerin akış davranış indeksleri  $0.22 \pm 0.01$  ile  $0.29 \pm 0.02$  aralığında tespit edilmiştir. Ayrıca, bezelye proteini formülasyonlarının termal stabilitesi, spirulina içerenlerden daha iyi performans göstermiştir. Moleküler kenetleme analizi, pektin-jelatin, pektin-spirulina ve pektin-bezelye proteini arasındaki bağlanma enerjilerinin sırasıyla -6.53; -7.85 ve -8.30 kcal/mol ile nispeten kararlı ve etkili olduğunu işaret etmektedir. Bezelye proteini ve spirulina bazlı hidrojeller, 3D baskı teknolojisi ve yağ ikamesi olarak potansiyele sahip olup, besleyici ve işlevsel özellikleriyle yenilikçi gıda ürünlerinin geliştirilmesini destekleyebilirler.

**Anahtar kelimeler:** Hidrojel, pektin, bezelye proteini, jelatin, spirulina

## THE EFFECT OF PEA PROTEIN AND SPIRULINA ADDITION ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF BINARY HYDROGEL FORMS

### ABSTRACT

This study focused on the development and rheological properties of pectin-gelatin binary hydrogels based on pea protein and spirulina due to their high water content, low calories, and satiety benefits. According to rotational and oscillatory tests, the consistency coefficients were 25% and 20% higher in the 6P1B sample (6% pectin, 0.5% gelatin, and 1% pea protein) compared to the 6P1S sample (6% pectin, 0.5% gelatin, and 1% spirulina), respectively. The flow behavior index ranged from  $0.22 \pm 0.01$  to  $0.29 \pm 0.02$ . Furthermore, the thermal stability of pea protein formulations outperformed those containing spirulina. Molecular docking analysis indicated that the binding energies between pectin-gelatin, pectin-spirulina, and pectin-pea protein were relatively stable and efficient, with values of -6.53, -7.85, and -8.30 kcal/mol, respectively. Pea protein and spirulina-based hydrogels show potential for use in 3D printing technology and as fat substitutes, and they can support the development of innovative food products with nutritional and functional properties.

**Keywords:** Hydrogel, pectin, pea protein, gelatin, spirulina

\* Sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: b.gulcebedis@klu.edu.tr

☎: (+90) 288 214 0514

Gülce Bedis Kaynarca; ORCID no: 0000-0001-7896-457X

## GİRİŞ

Son dönemde, yüksek su içeriği, düşük kalorisi, cazip lezzeti ve tokluk hissini artırıcı etkisi sayesinde jelli gıdalar giderek daha fazla ilgi görmektedir. Polisakkarit ve protein karışımları, tek başına kullanılan polisakkarit veya protein sistemlerine kıyasla jel yapılarının düzenlenmesinde genellikle daha başarılıdır (Yang vd., 2021).

Tek bir biyopolimer kullanılarak hazırlanan hidrojenlerin düşük su tutma kapasitesi, zayıf jel mukavemeti ve fiziksel kararsızlık gibi sınırlamalarını aşmak amacıyla, proteinler ve polisakkaritlerden oluşan ikili hidrojenler geliştirilmiştir (Zha vd., 2021). İkili hidrojen oluşturmak için protein-protein, polisakkarit-polisakkarit ve protein-polisakkarit gibi farklı kombinasyonlar kullanılabilir. Proteinler ve polisakkaritler, kovalent ve kovalent olmayan etkileşim yetenekleri sayesinde daha etkili bir şekilde ikili hidrojenler oluşturabilmektedirler (Hilal vd., 2023). Son yıllarda, farklı kimyasal özelliklere sahip yapı bileşenleriyle hazırlanan hidrojenler, jel bazlı sistemlerin mekanik ve mikroyapısal özelliklerini iyileştirme potansiyelleri nedeniyle giderek artan bir araştırma konusu olmuştur (Liu vd., 2023).

Polisakkaritler ve proteinler farklı biyopolimer sınıflarına aittir ve kimyasal yapıları, fiziksel özellikleri ve işlevsellikleri açısından büyük farklılık göstermektedirler (Yang vd., 2021). Bu karışımlar polimerler ve çözücü arasındaki farklı afiniteleri sayesinde daha geniş bir faz davranış yelpazesine sahiptirler. Bu karışımlar polisakkaritlerin reolojik özellikleri ile proteinlerin besleyici işlevlerini birleştirerek çeşitli, fonksiyonel jel ağı yapılarının geliştirilmesine olanak sunmaktadır (Hou vd., 2015).

Hidrojenler, gıda ambalajlarında antimikrobiyal aktivite sağlayarak ve nem kontrolü yaparak gıda kalitesini ve güvenliğini artıran, depolama ömrünü uzatan aktif ambalajların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, hidrofobik biyoaktif bileşiklerin (vitaminler, diyet lifleri, yağ asitleri, proteinler, probiyotikler, polifenoller, karotenoidler vb.) düşük su çözünürlüğü, kimyasal bozulma ve zayıf biyoyararlanım gibi

sorunlarını aşmak amacıyla, bu bileşenlerin gıdalara enkapsülleme sistemleriyle dahil edilmesi ve gastrointestinal sistemde hedeflenen bölgelere taşınmasında da büyük rol oynamaktadırlar (Klein ve Poverenov, 2020). Protein bazlı hidrojenlerin oluşturulmasında jelatin (Wang vd., 2023), zein (Melzener vd., 2023), yumurta proteini (Alavi ve Çiftçi, 2023), peynir altı suyu proteini (Yan vd., 2023), soya ve bezelye proteini (De Berardinis vd., 2023) kullanılmaktadır. Karbonhidrat bazlı hidrojenlerin yapısında ise aljinat (Wang vd., 2023), karragenan (Mirzaei vd., 2023), ksantan gum (Kamer vd., 2024), gellan gum (Xu vd., 2024), guar gum (Tanvar vd., 2024), agar (Cebrián-Llore vd., 2024), selüloz (Mo vd., 2024), nişasta (Koshenaj ve Ferrari, 2024), gum arabik (Kan vd., 2024), kitosan (Li vd., 2024) ve pektin (Ishwarya ve Nisha, 2022) kullanılmaktadır.

Pektin, bitki hücre duvarlarında doğal olarak oluşan temel olarak  $\alpha$ -(1-4)-bağlı D-galakturonik asit birimlerinin tekrar eden birimlerinden meydana gelen bir polisakkarittir (Said vd., 2023). Pektin hidrojenleri; doğal, yumuşak ve esnek yapıları, yüksek su içeriği, biyoyoumlulukları ve kendine özgü yapıları sayesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Ishwarya ve Nisha, 2022). Pektin, doğası gereği sert bir polimer olup, mekanik özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla modifiye edilmektedir (Gupta vd., 2014).

Jelatin, hayvan kollajeninden türetilen, suda çözünür ve yüksek moleküler ağırlıklı bir proteindir. Jelleşme, koyulaştırma, stabilizasyon, emülsifikasyon ve film oluşturma gibi işlevleri vardır. Bu özellikleri sayesinde jelatin, biyolojik olarak aktif bileşiklerin kapsüllemesi ve doku mühendisliği alanlarında da kullanılmaktadır (Günter vd., 2024).

Jelatin ve pektin, mekanik özelliklerini, su direncini ve stabiliteğini artırmak için çeşitli etkileşimler aracılığıyla birleştirilebilir. Negatif yüklü pektin molekülleri ile pozitif yüklü jelatin molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimler sayesinde tersinir hidrojenler oluşturulabilmektedir (Gupta vd., 2014).

Bezelye proteinleri, bitkisel protein bazlı gıdaların geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun nedeni yüksek besin değerleri, genetik modifikasyona uğramamış olmaları, erişilebilir olmaları, hipoalerjenik yapıları ve antioksidan, antihipertansif özellikleri ile bağırsak bakterilerini modüle etme gibi sağlık yararlarına sahip olmalarıdır (Zhang ve ark. 2024). Zhang vd., (2022) yapmış oldukları çalışmada pektinin bezelye proteinlerinin molekülleri arasındaki itici kuvvetleri artırarak küçük agregatların oluşması sağlayarak daha kararlı yapılar meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Mikroalgler, üstün besin değerleriyle yüksek kaliteli yeni gıda ürünleri için umut verici bileşen ve biyoaktif bileşik kaynaklarıdır. *Spirulina platensis*, mineral, vitamin ve protein bakımından zengin olup, anti-enflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir (Wang vd., 2023b). Büyük oranda yapısal biyopolimer (Protein ve karbohidrat) içerdiklerinde gıda ürünlerinde ekstürize edici, stabilize edici veya emülgatör olarak potansiyel bir rol oynayabilirler (Bernaerts vd., 2019). C-fikosiyanin (cPC), *Spirulina platensis*' den elde edilen ışık tutucu bir pigment proteindir. Antioksidan, anti-enflamatuar, anti-obezite ve anti-kanser aktivitelere sahiptir ve ayrıca fotodinamik tedavide kullanılabilir (Shi vd., 2024).

Reolojik özellikler, gıda ürünlerinin en önemli kalite unsurlarından biridir. Bu özellikler, sadece fiziksel görünümü açısından değil (örneğin istenen bir doku oluşturmak veya depolama sırasında faz ayrımı olaylarını önlemek) aynı zamanda duyuşsal algı açısından da (tüketim sırasında bir gıdanın ağızda bıraktığı his gibi) büyük öneme sahiptir (Bernaerts vd., 2019). Yukarıda da değinildiği üzere ikili hidrojel formları yapı geliştirilmesinde gelecek vadeden oluşumlardır. Pektin-jelatin bazlı hidrojel literatürde çalışılmış olmasına karşın düşük jelatin konsantrasyonlu ve yapıyı stabilize etmek için bitkisel kaynaklı protein içeren hidrojel yapıları araştırılmamıştır. Bitkisel protein bazlı gıdaların geliştirilmesinde, yüksek besin değerine sahip bezelye proteini, ikincil hidrojel yapısının oluşturulması amacıyla tercih edilmiştir. Bezelye

proteinine alternatif olarak potansiyel taşıyan spirulina tozu ise, ikili hidrojel geliştirilmesinde yenilikçi bir protein kaynağı olarak değerlendirilmiştir. Kolay erişilebilir ve ucuz kaynaklar kullanılarak kararlı ve stabil yapıların geliştirilmesi önem arz ettiği gibi geliştirilen ürünlerin besleyici ve fonksiyonel özellikler taşıması da bir o kadar önemli bir konudur. Tüm bunlar göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmada, kolay erişilebilir pektin ve jelatin ile hidrojel geliştirilmesi ve bu yapının bezelye proteini ve spirulina ile kuvvetlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu maksatla pektin konsantrasyonu değiştirilerek (%2, 4 ve 6) en stabil yapı reolojik olarak belirlenmeye çalışılacaktır. Geliştirilen hidrojel yapılarının moleküler etkileşimleri, moleküler kenetleme ile belirlenecektir. Çalışma neticesinde elde edilecek pektin-jelatin-bitkisel protein bazlı hidrojel yapılarının, 3D baskı teknolojisi ve yağ ikamesi olarak kullanılma potansiyeline ışık tutması hedeflenmektedir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Hidrojel üretiminde Bloom değeri 220 olan ticari sığır jelatini (Tijda Gıda Medikal Şirketi, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Karbonhidrat kaynağı olarak orta metoksilli elma pektini (Kimbiotek Kimyevi Maddeler San. Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. %82 proteine sahip bezelye proteini ve %68 proteine sahip spirulina tozu Kimbiotek Kimyevi Maddeler San. Tic. A.Ş. (İstanbul, Türkiye)' den temin edilmiştir.

### Yöntem

#### *Hidrojel formlarının hazırlanması*

İkili hidrojel geliştirilmesi için protein ve pektin solüsyonları ayrı bir şekilde hazırlanmış ve ardından 1:1 oranda birleştirilmiştir. Ön denemeler neticesinde belirlenen yüzde bezelye proteini ve spirulina oranları Çizelge 1'de verilmiştir. Bezelye proteini ve spirulina %2 oranda olacak şekilde saf suda manyetik karıştırıcı (Heidolph Instruments GmbH, Co., P/N: 506-11100-00) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından protein solüsyonu sıcaklığı 50-55°C arasına ısıtılmıştır.

Karışıma jelatin ilave edilmiş ve tamamen çözünmesi için 30 dakika karıştırılmıştır.

Pektin solüsyonu %4, 8 ve 12 olacak şekilde saf su ile 80°C'de manyetik karıştırıcı kullanılarak çözüldürülmüştür (Liu vd., 2017). Oda sıcaklığına gelen protein ve pektin solüsyonları 1:1

oranda 50°C'de 10 dakika boyunca karıştırılmış, ardından homojenizatör (Ultraturrax T18, IKA, Germany) yardımı ile yapının kuvvetlendirilmesi için 14000 rpm'de 2 dakika homojenize edilmiştir. Homojen hale gelen solüsyonlar hidrojel eldesi için 4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Formülasyon kodları çizelge 1'de belirtilmiştir.

Çizelge 1. Hidrojellerin pektin, jelatin ve doğal bitkisel protein içerikleri  
Table 1. Pectin, gelatin and natural vegetable protein content of hydrogels

Formülasyon Kodu	Pektin	Bezelye Proteini	Spirulina	Jelatin
6P1B	%6	%1	-	%0.5
4P1B	%4	%1	-	%0.5
2P1B	%2	%1	-	%0.5
6P1S	%6	-	%1	%0.5
4P1S	%4	-	%1	%0.5
2P1S	%2	-	%1	%0.5

#### İkili jellerin reolojik karakterizasyonu

Hidrojellerin reolojik özellikleri, sıcaklığı kontrol eden bir Peltier sistemine sahip Discovery Hybrid Rheometer-2 (TA Instruments, New Castle, ABD) kullanılarak rotasyonel ve salınımlı iki farklı deformasyon testi ile incelenmiştir. Ekipmanın kontrolü ve reolojik parametrelerin ölçülmesi TRIOS Yazılımı (V3.0) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler ise OriginPro 2016 yazılımı (OriginLab Corporation, ABD) kullanılarak analiz edilmiş ve görselleştirilmiştir.

Hidrojellerin salınım testi ile akış davranışları incelenmiştir. Analizde paralel plaka (ölçüm yüksekliği 1 mm; çap 40 mm) kullanılmıştır ve 10 saniyelik aralıklarla toplam 100 veri noktası toplanmıştır. Sabit kayma testi, 20°C'de 0.1-100 1/s kayma hızı ile gerçekleştirilmiştir. Akış davranışı, kıvam katsayısı ( $K$ , Pa.s<sup>n</sup>) ve akış davranışı indeksi ( $n$ ) değerleri, en yüksek belirleme katsayısına ( $R^2$ ) sahip, yatışkan kesme akış davranışlarını en iyi tanımlayan Power law modeli kullanılarak belirlenmiştir. Power law modeli (Ostwald-de Waele, denklem 1):

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

Burada  $\sigma$ , kayma gerinimi (Pa) ve  $\dot{\gamma}$  kayma hızıdır (1/s).  $K$  kıvamlilik indeksi (Pa.s<sup>n</sup>) ve  $n$  akış davranışı indeksini ifade etmektedir.

Hidrojellerin sıcaklığa bağlı akış davranışları da incelenmiştir. Hidrojeller 10°C'den 50°C'ye 1°C/dakika hızla ısıtılmış ve viskozite ve kayma gerinimleri belirlenmiştir. Termo-viskoelastik özelliklerin belirlenmesi için sıcaklık taraması, sabit kayma koşulları altında ( $f = 1$  Hz ve  $\gamma = \%1$ ) gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin doğrusal viskoelastik bölgesi (LVR) belirlendikten sonra, LVR bölgesinde 20°C'de frekans tarama testi gerçekleştirilmiş ve frekans aralığı 0.1-100 rad/s olarak uygulanmıştır. Bu testler sonucunda depolama modülü ( $G'$ , elastik rijitlik ölçüsü) ve kayıp modülü ( $G''$ , viskoz sertliğin bir ölçümü) değerleri ölçülmüştür. Örneklerin  $G'$  ve  $G''$  değerlerinin karşılaştırılması için Ostwald de Waele (Power Law) modeli (denklem 2 ve 3) kullanılmıştır:

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

$$G'' = K(\omega)^{n'} \quad (3)$$

Burada  $G$ , kayma gerilimini;  $K$ , kıvam katsayısını (Pa.s<sup>n</sup>);  $\omega$ , açısal hızı; ve  $n$ , akış davranış indeksini göstermektedir. Kompleks viskozite, kompleks modül (denklem 4) üzerinden şu şekilde (denklem 5) hesaplanmıştır:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (4)$$

$$\eta^* = G^*/\omega \quad (5)$$

#### Moleküler kenetlenme

Geliştirilen hidrojel sistemlerinin protein- ligand molekülleri arasındaki interaksiyonu belirlemek için moleküler simülasyon kullanılmıştır. Moleküler yerleştirme (kenetleme) simülasyonları için AutoDock Vina (Pyrex; <https://pyrx.sourceforge.io>), Discovery Studio (<https://www.3ds.com/products/biovia/discovery-studio>) ve UCSF Chimera (California Üniversitesi, San Francisco, CA, ABD) yazılımları kullanılmıştır. Heterotrimer yapıya sahip, üçlü helikal bir molekül olan Tip I Kollajeni, jelatini modellemede (PDB ID: 5cti Protein Data Bank of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <https://www.rcsb.org>) kullanılmıştır. Bezelye proteininin ana bileşeni olan 11S Legumin (PDB ID: 3KSC) (Zhang vd., 2022) spirulina ana bileşeni olan c-fikosiyanın (PDB ID: 1CPC) diğer model proteinler olarak seçilmiştir. Pektin molekülünü yerleştirmeyi simüle etmek için çok büyük olduğundan, temsili bir ligand olarak galakturonan (tetragalakturonik asit, CID 5459352) seçilmiştir. PyMol yazılımı bağlanma bölgelerinin görselleştirilmesinde, 2 boyutlu diyagramların oluşturulmasında ise Proteins Plus (DoG Site Scorer) (<https://proteins.plus/>) kullanılmıştır. 3 boyutlu yapılar da ilgili protein-ligand temas bölgelerinin tam otomatik tespitinde PLIP algoritmasından (<https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>) yararlanılmıştır.

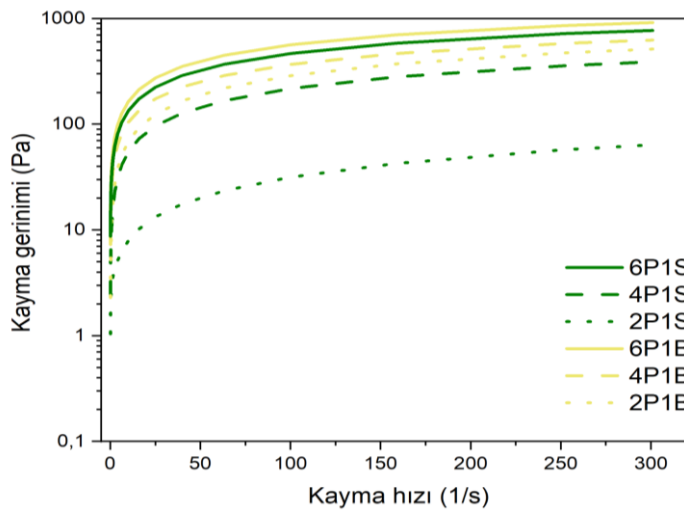
#### İstatistiksel analiz

Örneklerin istatistiksel anlamlılığı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmiştir. Deneyler üç tekrür halinde gerçekleştirilmiş ve numuneler arasındaki farklılıklar SPSS 17.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) ile Duncan'ın çoklu aralık testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak %95 seçilmiştir.

#### BULGULAR VE TARTIŞMA

##### Hidrojelilerin akış davranışlarının incelenmesi

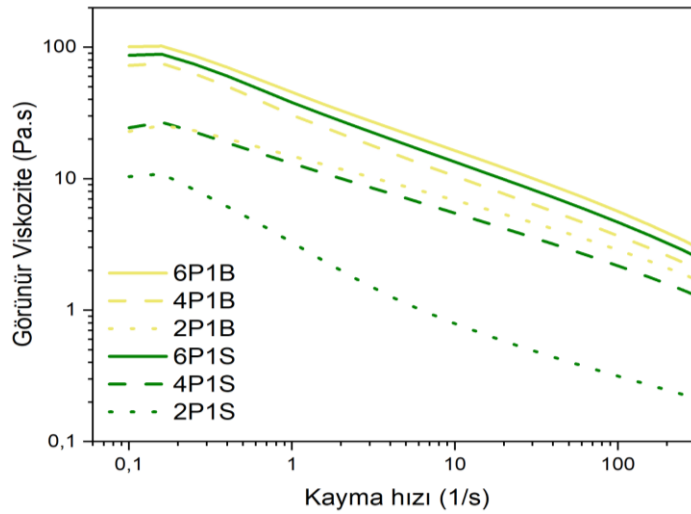
20°C'de, ikili jellerin reolojik karakterizasyonunu ortaya çıkarmak için viskozite ve kayma gerilimi değerleri sabit kaymada incelenmiştir. Farklı formülasyonlar için kayma gerilimi ve kayma hızı arasındaki ilişki Şekil 1'de gösterilmiştir. Kayma hızı arttıkça, kayma gerilimi tüm örneklerde artmaktadır. Bu durum ikili jellerin kayma ile incelen (shear thinning) davranış gösterdiğini belirtmektedir. 6P1B ve 6P1S formülasyonları için kayma gerilimi değerleri, kayma hızı arttırıldığında en yüksek olmuştur. Bu da pektin-spirulina ve pektin-bezelye proteini kombinasyonunun viskoziteyi arttırarak kalın ve tutarlı bir doku oluşturmak için birlikte çalıştığını kanıtlamaktadır. 2P1S formülasyonu daha az pektin içeriğine bağlı olarak, Şekil 1'de de görüldüğü gibi daha düşük bir başlangıç kayma gerilimi göstermiştir. Bu durum daha az yapısal stabilite ve sertliğe işaret etmektedir.



Şekil 1. Hidrojellerin kayma hızına bağlı rotasyonel test reogramları  
Figure 1 Shear rate dependent rotational test rheograms of hydrogels

Farklı pektin ve protein oranlarına sahip ikili jellerin kayma hızının bir fonksiyonu olarak görünür viskozitesi Şekil 2'de gösterilmektedir. Kayma hızının artmasıyla görünür viskozitedeki doğrusal olmayan düşüş, tüm jellerin kayma incelmesi davranışına sahip psödoplastik akışkanlar olduğunu göstermiştir. Kayma inceltici hareketlilik esas olarak kayma hızındaki artış ve moleküler zincir dolanıklığındaki azalmadan kaynaklanmaktadır (Cai vd., 2019; Wu vd., 2009).

Moleküller akış yönüne göre kolayca yeniden yönlendirilmekte ve bu da görünür viskozitede önemli bir düşüşe neden olmaktadır (Zhou vd., 2021). Kayma hızı arttıkça daha yüksek oleojel fraksiyonlarına sahip bigellerin viskozitesindeki benzer düşüş, sodyum aljinat hidrojel ve balmumu oleojeli ile oluşturulan diğer bigelerde de gözlenmiştir (Martin vd., 2019). 2P1S en düşük görünür viskoziteye sahip formülasyon olmuştur.



Şekil 2. Kayma hızına bağlı olarak hidrojel jellerin görünür viskozite ( $n_{app}$ ) değişimleri  
Figure 2. Apparent viscosity ( $n_{app}$ ) changes of hydrogels depending on shear rate

Ostwald-de Waele Power Law modeli, psödoplastisiteyi ve viskozitedeki değişiklikleri (Tablo 2)  $K$  ve  $n$  değerleri ile karakterize etmek için kullanılmıştır. Çizelge 2'de görüldüğü gibi, tüm formülasyonlarda  $n$  değeri 1'den küçük bulunmuştur. Bu durum geliştirilen ikili jellerin güçlü kesme inceltme davranışı sergilediğini göstermektedir. Pektin içeriği arttıkça  $n$  değeri azalmıştır. Bezelye proteini içeren formülasyonlar daha düşük  $n$  değerine sahiptir ( $p < 0.05$ ). Bu durum bezelye proteini ilaveli örneklerin daha güçlü psödoplastisiteye ve daha iyi ekstrüde edilebilirliğe sahip olduklarını göstermektedir. İkili jellerin kayma inceltme özelliklerine hem pektin hem de proteinler katkıda bulunmuştur. Pektin ve protein hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri aracılığıyla üç boyutlu bir ağ yapısı oluşturmuştur (Swe ve Asavapichayont, 2018). Yüksek bir kesme hızı uygulandığında, her iki fazın ağları hızla tahrip olmuş ve düşük

viskozite sergilemiştir (Şekil 2). Örneklerin farklı viskoziteleri  $K$  değeri ile açıklanabilir. Örneklerin,  $K$  değeri pektin ilavesiyle artmış ( $p < 0.05$ ) ve 6P1B formülasyonu en yüksek  $54.79 \pm 2.22 K$  (Pa.s<sup>n</sup>) değeri göstermiştir. Protein ilavesinin  $K$  değerini önemli ölçüde ( $P < 0.05$ ) yükselttiği, proteinler için de ise bezelye proteinin daha etkili olduğu tespit edilmiştir. 3D baskı için kullanılacak bir gıda mürekkebinin uygun reolojik özelliklere sahip olması gerekir. Kesme incelmesi davranışı, bir nozülde ekstrüde edilirken iyi akışkanlık (daha yüksek kesme hızlarında daha düşük viskozite) ve basıldıktan sonra iyi bir stabilite ve şekil tutma kapasitesi (daha düşük kesme hızlarında daha yüksek viskozite) sağladığı için bu davranışı sergileyen polisakaritler ve proteinler gibi biyopolimerler tercih edilmektedir (Lenie vd., 2024). 3D baskı teknolojisi açısından pektin-jelatin ikili jellerinin reolojik özellikleri önemlidir. Pektin, ek baskı sonrası işlemlere ihtiyaç

duymadan stabil yapılar oluşturma kabiliyeti nedeniyle 3D baskılı iskelelerin geliştirilmesinde kilit bir bileşen olarak bildirilmiştir (Lapomarda vd., 2021). Jelatin ise kendi kendini destekleme özellikleri sunar ve jelleşme sürecinde önemli bir rol oynar (Varela vd., 2023). Hidrojellerdeki

pektin ve jelatin kombinasyonu, doku mühendisliği uygulamaları için uygun birbirine bağlı gözeneklere sahip karmaşık şekilli 3D yapılar oluşturmada umut vaat ettiğini göstermiştir (Lapomarda vd., 2021).

Çizelge 2. İkili jellerin Power-Law modeline ait parametreleri  
Table 2. Parameters of the Power-Law model for binary hydrogels

Örnek	$K$ (Pa.s <sup>n</sup> )	$n$	$R^2$
6P1B	54.79±2.22 <sup>a</sup>	0.49±0.01 <sup>d</sup>	0.998±0.00
4P1B	33.04±0.86 <sup>c</sup>	0.52±0.01 <sup>c</sup>	0.999±0.00
2P1B	19.49±0.81 <sup>cd</sup>	0.58±0.01 <sup>b</sup>	0.998±0.00
6P1S	43.91±1.51 <sup>b</sup>	0.51±0.01 <sup>c</sup>	0.998±0.00
4P1S	15.61±0.49 <sup>e</sup>	0.57±0.01 <sup>b</sup>	0.999±0.00
2P1S	1.89±0.12 <sup>f</sup>	0.62±0.01 <sup>a</sup>	0.997±0.00

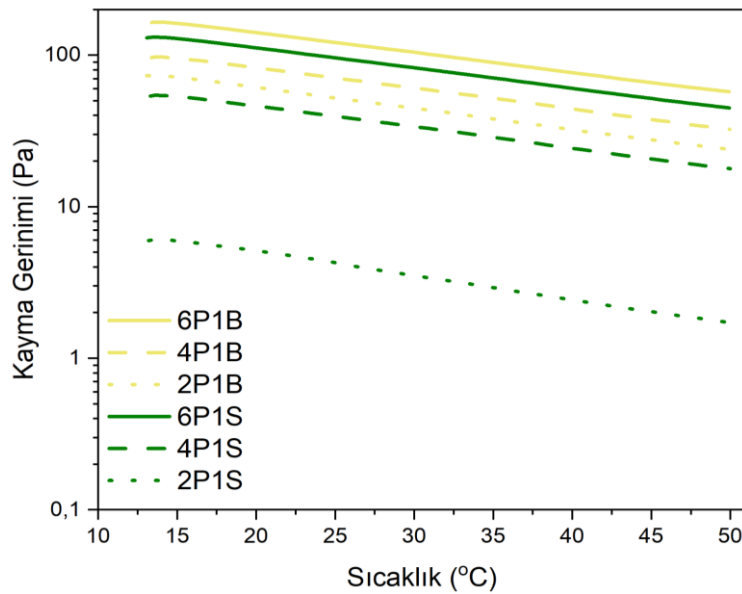
<sup>a-f</sup> Aynı sütunda ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

<sup>a-f</sup> It shows the statistical differences between the means in the same column ( $P < 0.05$ ).

### Sıcaklığa bağlı olarak hidrojellerin termoreolojik özellikleri

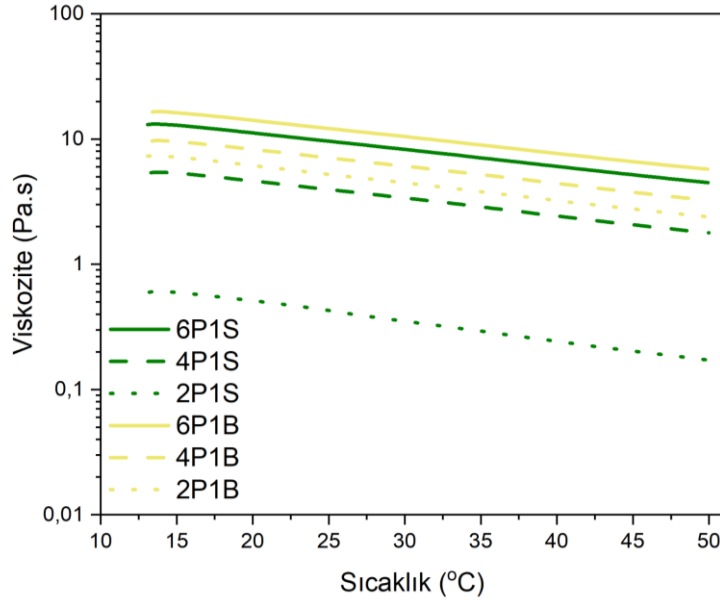
Hidrojellerin sıcaklıkla ilgili termoreolojik özellikleri viskozite ve kayma gerilimi açısından incelenmiştir. Jel formülasyonlarının sıcaklığa bağlı davranışları Şekil 3 ve Şekil 4'te gösterilmiştir. Jellerin başlangıçtaki kesme mukavemeti sıcaklıktaki artışla birlikte azalma

göstermiştir. Tüm formülasyonlarda benzer eğilim gözlenmiştir. Bu durum sıcaklık arttıkça jel yapısında genel bir yumuşama olduğunu gösterir. 6P1B ve 6P1S gibi daha yüksek pektin seviyelerine sahip formülasyonlar, daha düşük sıcaklıklarda daha yüksek başlangıç kesme mukavemetleri göstererek daha sert ve kararlı bir jel ağı oluşturmuşlardır.



Şekil 3. İkili jellerin sıcaklığa bağlı mukavemet değişimleri  
Figure 3. Temperature dependent dynamic changes of binary gels





Şekil 4. Hidrojellerin viskozitelerinin sıcaklığa bağlı değişimi  
Figure 4. Temperature-dependent change in viscosity of hydrogels

Şekil 4'te gösterildiği gibi, 13°C ile 50°C arasında değişen sıcaklık taraması emülsiyon viskozitesinin sıcaklığa bağımlılığını göstermektedir. Tüm formülasyonlar, artan sıcaklıkla birlikte viskozitede düşüş eğilimi sergilemiştir. Jel sistemlerinde gözlenen artan sıcaklıkla viskozitedeki düşüş, termal enerji uygulandıkça jel ağı içindeki moleküller arası etkileşimlerin bozulmasına atfedilen yaygın bir olgudur (Yu vd., 2023). Daha yüksek pektin içeriğine sahip formülasyonlar (6P1B ve 6P1S) sıcaklık aralığı boyunca daha yüksek viskozite değerlerini koruyarak pektinin jel viskozitesini korumadaki rolünü vurgulamaktadır. Sıcaklıkla birlikte viskozitede hafif bir düşüş olduğunda, bu durum jel sisteminin genel özellikleri üzerinde minimal bir etki olduğunu gösterebilir. Benzer bulgular pektin jelleri ile yapılan araştırmalarda viskozitede 5 ila 2 mPas gibi küçük düşüşler bildirilmiştir (Morris vd., 2010). Aynı zamanda protein-protein interaksiyonuna bağlı olarak jelatin bazlı formüle spirulina ve bezelye proteininin ilavesi ile sıcaklık artışına bağlı olarak viskozitede önemli bir düşüş görülmemiştir. Bu olgu, protein-protein etkileşimlerinin doğasına ve proteinlerin farklı sıcaklıklarda geçirdiği yapısal değişikliklere bağlanabilir. Woldeyes vd., (2020) tarafından yapılan araştırma, protein-protein etkileşimlerinin

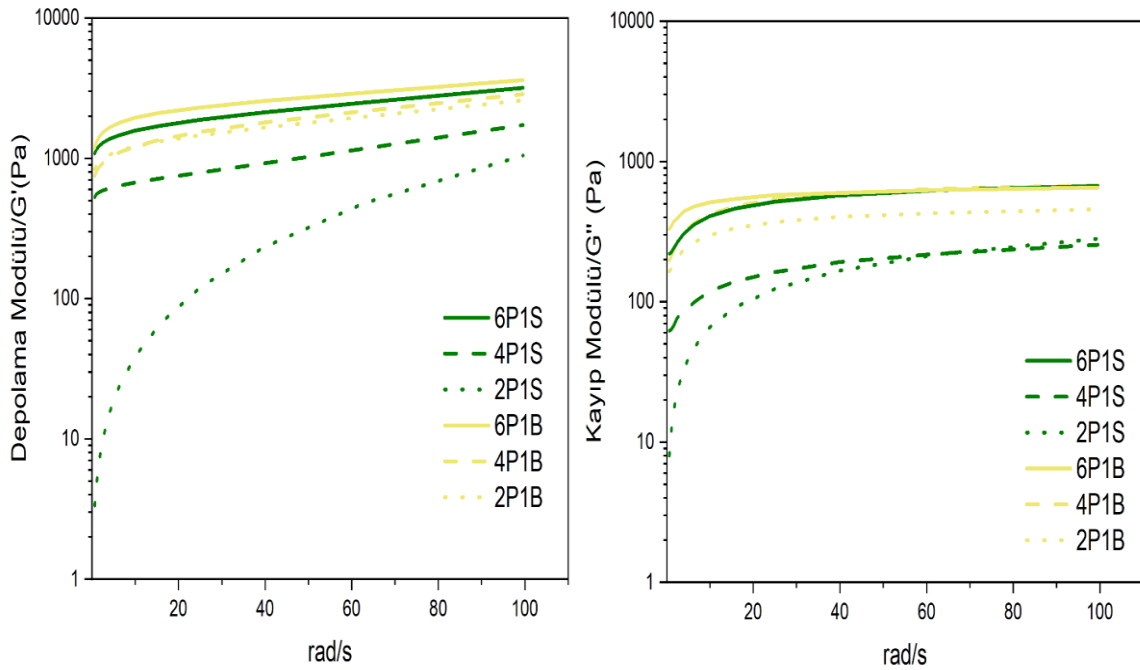
güçlü bir sıcaklık bağımlılığı sergilediği bildirilmiştir. Ayrıca, Santos vd., (2022) çalışması soya ve bezelye proteinlerinin emülsiyonlarla uyumluluğunu vurgulayarak, bu proteinlerin iyi stabiliteye sahip yapışkan ağlar oluşturabileceğini ve bunun da formülasyonlarda gözlemlenen viskozite davranışında rol oynayabileceğini göstermektedir. Spirulina (6P1S ve 4P1S) ile stabilize edilen jeller, aynı sıcaklıkta bezelye proteini (6P1B ve 4P1B) içerenlere kıyasla daha düşük viskozite değerleri göstermektedir. Bu da bezelye proteininin jel sisteminin viskozitesine daha fazla katkıda bulunduğunu göstermektedir. Sahagún vd., (2018), protein ilavesinin genellikle viskoziteyi artırdığını ve bezelye proteininin en yüksek etkiyi gösterdiğini ortaya koyarak, formülasyonlarda kullanılan spesifik protein kaynağının sıcaklıkla viskozite değişikliklerini etkileyebileceğini bildirmiştir. 2P1S formülasyonu, düşük pektin ve spirulina içeriğine bağlı olarak stabilize edici etkisini yansıtacak şekilde, sıcaklık aralığı boyunca en düşük viskoziteyi göstermiş ve sıcaklık değişiminden daha çok etkilenmiştir. Daha yüksek pektin ve protein içeriğine sahip formülasyonlar daha iyi termal stabilite göstermiştir. Termal stabilitesi yüksek hidrojel formları, 3D baskı ve püskürtmeli

kurutma ile enkapsülasyon gibi ısı işlem içeren gıda proseslerinde kullanım potansiyeline sahiptir.

#### Hidrojenlerin dinamik salınım davranışları

Frekans testi  $G'$  ve  $G''$  değerini karşılaştırarak bir malzemenin viskoelastik özellikleri ve stabilitesi hakkında fikir vermektedir (Stojkov vd., 2021). Zamanla, partiküller veya moleküller arası bağlar hem uygulanan güçle hem de kendiliğinden oluşarak ya da kırılarak şekillenip yapısal değişikliklere neden olabilmektedir (Anvari ve Chung, 2016).  $20^{\circ}\text{C}$ ' de örneklerin çoğunluğunda depolama modülünün kayıp modülünden 2 log daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 5). Bu da hidrojenlerin katı benzeri davranış gösterdiklerine işaret etmektedir. Açıl hızın artmasına bağlı olarak 2P1S örneği hariç diğer hidrojenlerin depolama ve kayıp modüllerin de kademeli bir artış meydana gelirken 2P1S örneğinin birikim modülünde hızlı bir artış meydana gelmiştir. Bu

durum hidrojen yapısının kararlılığını koruyabilmesi için %2 pektin miktarının yetersiz kalması ile açıklanabilir. Farklı pektin konsantrasyonlarından bağımsız olarak bezelye proteini ilaveli örneklerin reolojik modüllerinin spirulina ilaveli örneklere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bezelye proteini ilaveli hidrojenlerin kararlılıklarını gösteren  $\tan\delta$  ( $G''/G'$ ) değerleri 0.24 ile 0.13 arasında değişiklik göstermektedir. Bu değer spirulina ilaveli örneklerde 0.18 ile 1.28 arasındadır. Pektin konsantrasyonunun artması ile bezelye proteini ile olan interaksiyonun arttığı gözlenmektedir. Bezelye proteini jellerinin yapısını geliştirmek için güçlendirici bir ajan olarak pektinin kullanıldığı bir çalışmada pektin konsantrasyonu arttıkça çalışmamızla benzer şekilde reolojik olarak yapının olumlu yönde değiştiği tespit edilmiştir (Zhang vd., 2022b).



Şekil 5. Hidrojenlerin açıl hızına bağlı depolama ve kayıp modüllerindeki değişimler

Figure 5. Changes in storage and loss modulus of hydrogels due to angular frequency

Yapısal sıkılık ve kararlılıklarının değerlendirilmesi amacıyla açıl hızının bir fonksiyonu olarak birikim ve kayıp modülünün Power-Law modeline uyumunu gösteren parametreler Tablo

3'te verilmiştir. Hidrojenlerin elastik ve viskoz modüllerinin kıvam katsayıları ( $K'$  ve  $K''$ ) karşılaştırıldığında en yüksek değerler  $1210.09 \pm 52.54$  ve  $359.66 \pm 6.58 \text{ Pa.s}^n$  ile 6P1B

örneğinde bulunurken bunu 6P1S örneği takip etmiştir. Pektin konsantrasyonunun azalmasına bağlı olarak  $K'$  ve  $K''$  değerlerinde azalma meydana gelmektedir. Örneklerin tümünde  $K'$  değerinin  $K''$  değerinden yüksek olması katı benzeri davranışı destekler niteliktedir. Yüksek kıvam katsayısına ( $K$ ) karşılık düşük akış indeksi ( $n$ ) daha büyük moleküler dolaşımı ve iç içe

geçmeyi temsil etmektedir (Ghica vd., 2016). Elastik modülde en düşük akış davranışının 6P1B ve 6P1S viskoz modülde ise 6P1B örneğinde olduğu belirlenmiştir. Kayma incilmesi davranışı sergileyen yapılarda  $n$  değerinin 0 ile 1 arasında çıkması ve bu değerın sıfıra yakın olması beklenmektedir (Ghanbari vd., 2017). Buna uymayan tek örnek 2P1S örneği olmuştur.

Çizelge 3. Hidrojellerin açısal hızla bağlı birikim modülü parametrelerindeki değişimler  
Table 3. Changes in storage modulus parameters of hydrogels depending on angular frequency

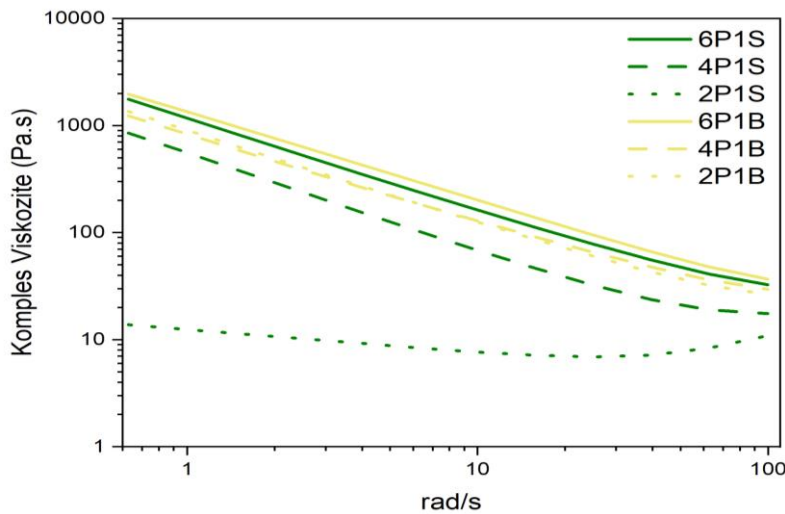
Örnek	$K'$	$n'$	$R^2$	$K''$	$n''$	$R^2$
6P1B	1210.09±52.54 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>c</sup>	0.97±0.00	359.66±6.58 <sup>a</sup>	0.14±0.01 <sup>c</sup>	0.98±0.00
4P1B	961.99±55.89 <sup>d</sup>	0.29±0.02 <sup>b</sup>	0.95±0.00	226.30±8.99 <sup>b</sup>	0.25±0.01 <sup>c</sup>	0.98±0.00
2P1B	759.03±61.21 <sup>c</sup>	0.24±0.02 <sup>d</sup>	0.92±0.00	178.55±4.46 <sup>c</sup>	0.21±0.01 <sup>d</sup>	0.99±0.00
6P1S	1006.03±68.73 <sup>b</sup>	0.22±0.02 <sup>c</sup>	0.93±0.00	228.67±6.32 <sup>b</sup>	0.24±0.01 <sup>c</sup>	0.99±0.00
4P1S	415.85±61.68 <sup>e</sup>	0.26±0.04 <sup>c</sup>	0.80±0.00	58.03±1.81 <sup>d</sup>	0.32±0.01 <sup>b</sup>	0.99±0.00
2P1SB	0.60±0.08 <sup>f</sup>	1.62±0.03 <sup>a</sup>	0.99±0.00	15.46±0.85 <sup>e</sup>	0.65±0.01 <sup>a</sup>	0.99±0.00

<sup>a-f</sup> Aynı sütunda ortalamalar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

<sup>a-f</sup> It shows the statistical differences between the means in the same column ( $P < 0.05$ )

Şekil 6'da görüleceği üzere açısal hız 0.1- 40 rad/s aralığında örneklerin tümü azalan bir kompleks viskozite sergilemişlerdir. Bu durum, makromoleküler bağlantıların ve zincir donanımlarının açısal hız etkisiyle bozulması sonucu gözlemlenen psödoplastik (kayma incilmesi) davranışa işaret etmektedir. Ancak 2P1S örneğinde 40 rad/s açısal hızdan sonra hafifte olsa viskozitede bir artış görülmektedir. Bu tip bir kalınlaşma akışkanlarda, parçacıklar daha sık ve yoğun çarpışmaları neticesinde geçici

yapıların veya kümelerin oluşmasına yol açarak akışa karşı direnci ve dolayısıyla viskoziteyi arttırmaktan kaynaklı olabilmektedir (Rosti ve Takagi 2021). Bu durum düşük pektin konsantrasyonlarında spirulinanın yapının kararlılığını sağlamada yetersiz kaldığını göstermektedir. Gıda ambalajlama sistemlerinde, daha dayanıklı ve plastik türevlerine alternatif film yapıların geliştirilmesinde pektin-jelatin-bezelye proteini bazlı karışımların kullanılabilirliği öne sürülebilir.

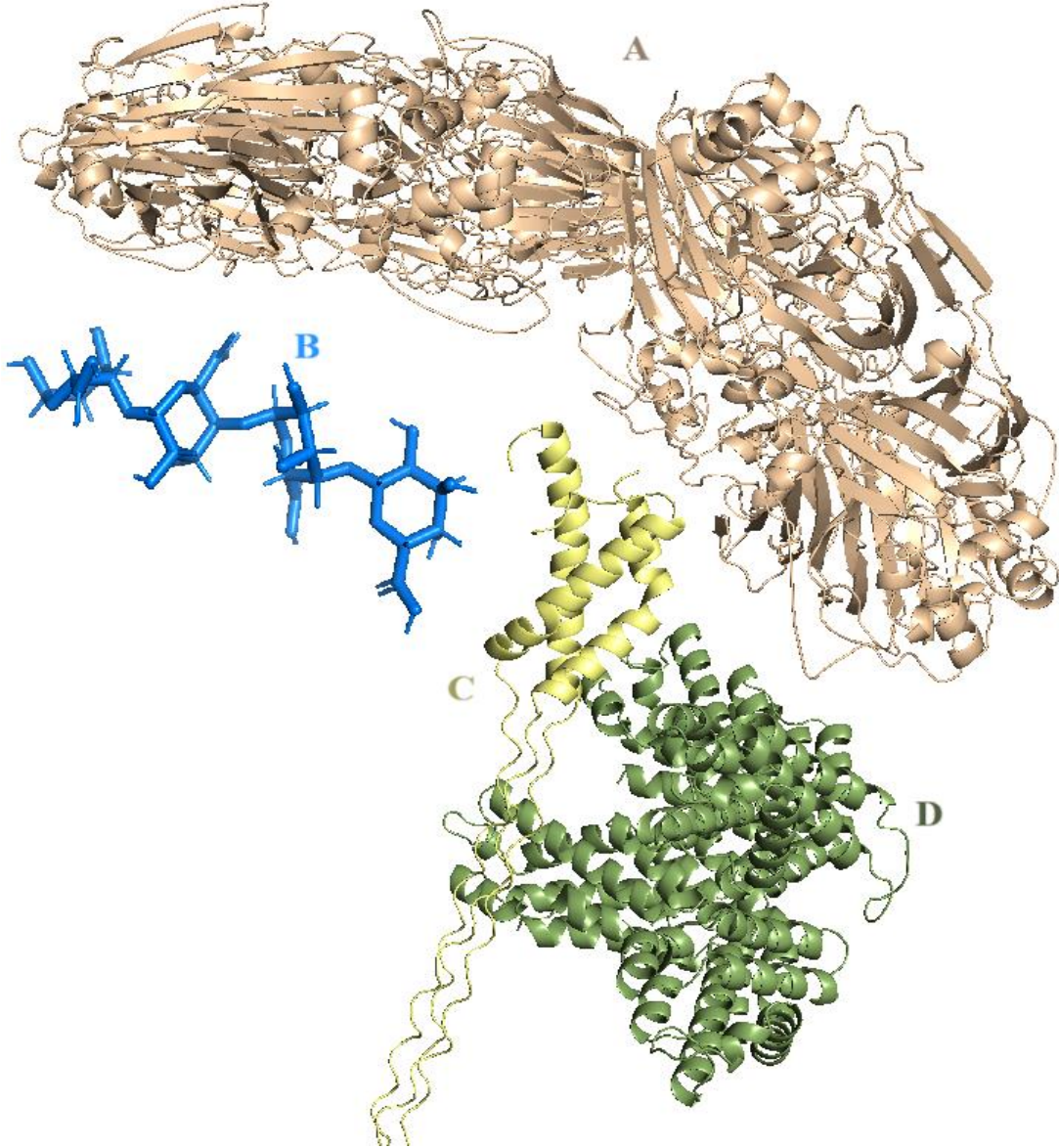


Şekil 6. Açısal hızın hidrojellerin kompleks viskozite ( $n^*$ ) değerleri üzerine etkisi  
Figure 6. Effect of angular frequency on complex viscosity ( $n^*$ ) values of hydrogels

**Moleküler kenetleme ile pektin ve proteinler arasındaki etkileşim**

Bezelye proteini (Şekil 7A), jelatin (Şekil 7C) ve spirulina (Şekil 7D) ile pektin (Şekil 7B) arasındaki etkileşim olasılıklarını araştırmak ve potansiyel bağlanma yerlerini belirlemek amacıyla moleküler kenetleme gerçekleştirilmiştir. En yüksek kenetlenme skoru, en düşük bağlanma enerjisine

karşılık gelmektedir. Ve bu da en güçlü protein-ligand bağlanma afinitesini göstermektedir. AutoDock Vina, kenetlenme skorunu, van der Waals, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimlerin katkıda bulunduğu enerjiye dayalı olarak, kcal/mol cinsinden tahmin edilen bağlanma afinitesi olarak vermektedir (Yin vd., 2020).

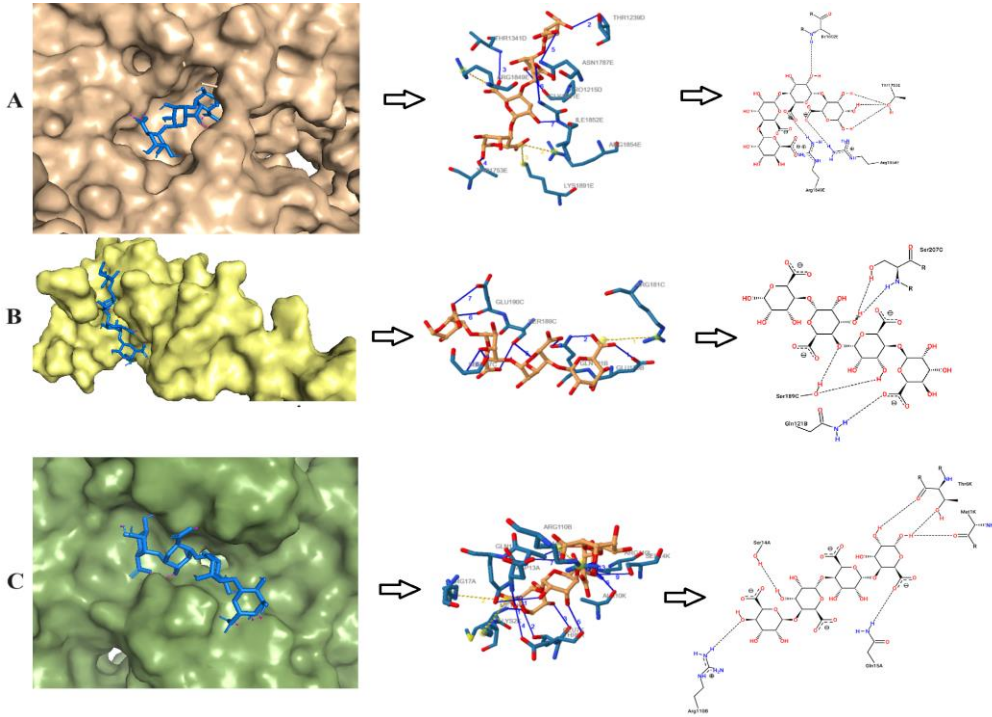


Şekil 7. A: Bezelye Proteini (11S legumin), B: Pektin (Tetragalakturanik asit), C: Jelatin (Tip 1 Kollajen) ve D: Spirulina (cPC) 3D simülasyonu

Figure 7. 3D simulation of A: Pea Protein (11S legumin), B: Pectin (Tetragalacturonic acid), C: Gelatin (Type 1 Collagen) and D: Spirulina (cPC)

Bezelye proteini-pektin, jelatin- pektin ve spirulina-pektin bağlanma bölgelerinin 3D ve 2D simülasyonu sırasıyla Şekil 8A, B ve C' de gösterilmiştir. Bezelye proteininin ana bileşeni olan 11S legumin ile pektin arasındaki bağlanma enerjisi ve mesafesi -8.30 kcal/mol ve 1.93 Å olarak belirlenmiştir. Treonin (Thr) kalıntı amino asidi ile 1239D, 1341D ve 1753E bölgelerinden sırasıyla 3.35, 2.74 ve 2.33 Å bağlanma mesafesinde hidrojen bağı oluşturduğu tespit edilmiştir. Treonin, yan zincirinde bulunan hidroksil grubu sayesinde hem hidrojen bağı vericisi hem de alıcısı olarak işlev görmektedir. Bu özellik, ligand ile güçlü hidrojen bağları kurarak ligand-protein kompleksinin stabilizasyonunu sağlamaktadır (Smith vd., 2002). 11S legumin ile tetragalakturanik asit (TGT) arasında Pro-1215D, Asn-1787E, Gly-1851E ve Ile-1852E kalıntı amino asitleri ve bağlanma konumlarında 2.58, 3.02, 3.55 ve 1.90 Å mesafede diğer hidrojen bağları tespit edilmiştir. Hidrojen bağlarının genel olarak yakın mesafede ve yüksek çözünürlükte olduğu görülmektedir. Tuz köprüsü,

zıt yüklü kimyasal gruplar veya atomlar arasındaki elektrostatik çekim ile hidrojen bağı birleştiren kovalent olmayan bir etkileşimdir. Bu nedenle, bu etkileşimin gücü sıradan bir hidrojen bağının gücünden daha fazladır (Ferreira de Freitas ve Schapira, 2017). TGT'nin karboksil grupları ile Arg-1849 (4.83), Arg-1854 (3.64) ve Lys-1891 (3.92) kalıntı amino asitleri arasında elektrostatik etkileşimler ile tuz köprüleri olduğu tespit edilmiştir. Peptit hidrojenlerin etkili jelleşme stratejilerinde Lysin ve argininin (Arg) elektrostatik etkileşimleri önemli rol oynamaktadır (Sedighi vd., 2023). Bu nedenle Arginin (Arg), yüksek bağlanma afinitesi ile elektrostatik etkileşimleri hidrojenlerin stabilitesine katkıda bulunabilir (Cao vd., 2022). Protein ve ligand (pektin) arasındaki ara yüzeydeki amino asit kalıntılarının analizi, bezelye proteinin pozitif yüklü amino asitlerinin galakturonanın negatif yüklü karboksil gruplarıyla elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı kurabileceğini göstermiştir (Zhang vd., 2022b).



Şekil 8. A: Bezelye proteini (11S legumin) ve pektin (TGT), B: Jelatin (Tip 1 kollajen) ve pektin, C: Spirulina (cPC) ve pektin arasındaki moleküler kenetlenmenin 3D ve 2D simülasyonu  
Figure 8. 3D and 2D simulation of molecular docking. A: Pea protein (11S legumin) and pectin (TGT), B: gelatin (type 1 collagen) and pectin, C: Spirulina (cPC) and pectin

Jelatin-pektin ve spirulina-pektin arasındaki etkileşim skorları sırasıyla -6.53 ve -7.85 kcal/mol olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan proteinlerin TGT ile bağlanma enerjileri -5.00 kcal/mol'den daha düşük bulunmuştur. Bu da pektin ile protein bağlanmasının hidrojel formülasyonları için nispeten kararlı ve etkili olduğunu işaret eder (Zhang vd., 2023). Jelatin-pektin etkileşiminde Glu-120B (2,94 Å), Gln-121B (2.20 Å), Gln-121B (3.22 Å), Ser-189C (2.28 Å), Ser-189C (2.99 Å), Glu-190C (3.59 Å), Glu-190C (3.18 Å), Ser-207C (1.99 Å) ve Ser-207C (2.23 Å) kalıntı amino asitleri ile 9 adet hidrojen bağı Arg-181C (5.30 Å) ile ise tuz köprüsü kurulmuştur. Serinler membran proteinlerinin transmembran alanlarında bulunan en yaygın polar kalıntılardır ve treonin gibi ligand-protein kompleksinin stabilizasyonuna katkı sunarlar (Smith vd., 2002). Jelatin-pektin etkileşiminde kalıntı aminoasit olarak en fazla serin ile yakın mesafede etkileşim olması güçlü interaksiyona işaret etmektedir.

C-fikosiyanin (cPC) ile TGT etkileşimi incelendiğinde en fazla bağlanma bölgesinin bu etkileşimde olduğu görülmektedir. Lys-2K, Arg-17A, Arg-110B ve Arg-110L kalıntı amino asitler ile 4.51, 5.23, 4.60 ve 5.43 Å mesafeden 4 adet tuz köprüsü ile elektrostatik etkileşim tespit edilmiştir. Bununla beraber Met-1K (3.27 Å), Thr-6K (2.63 Å), Thr-6K (2.35 Å), Glu-7K (3.17 Å), Glu-7K (2.75 Å), Ala-10K (2.32 Å), Asp-13A (3.38 Å), Ser-14A (2.13 Å), Ser-14K (2.82 Å), Gln-15A (2.26 Å), Gln-15A (3.17 Å), Arg-110B (2.44 Å) ve Arg-110B (2.24 Å) olacak şekilde oldukça yakın mesafeden 13 adet hidrojen bağı kurulmuştur. Diğer proteinlerden farklı olarak pektin kalıntı arginin ile hem elektrostatik hem de hidrojen bağı ile bağlanmıştır. Moleküler kenetleme sonuçlarının reolojik verilerle uyumlu olması, gıda matrislerinde kullanılacak formülasyonların önceden belirlenmesine olanak tanıyarak, zaman ve kaynak tasarrufu açısından büyük önem taşımaktadır. Kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip pigment protein ile pektin arasındaki bu kuvvetli etkileşim yapısal olarak stabil ve fonksiyonel hidrojel yapılarının geliştirilmesi için umut vaat etmektedir.

### SONUÇ

Bu çalışmada bezelye proteini ve spirulina bazlı pektin-jelatin ikili jelleri başarıyla geliştirilmiş ve ikili hidrojel formlarının reolojik özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bezelye proteini ve spirulina ilavesi, hidrojelatin stabilitesini ve viskoelastik özelliklerini büyük ölçüde geliştirmiştir. Tüm formülasyonlar kesme inceltme davranışı gösterirken, bezelye proteini içerenler spirulina içeren formülasyonlara kıyasla daha belirgin psödoplastisite ve gelişmiş ekstrüde edilebilirlik sergilemiştir. Bezelye proteininin hidrojelatin akış davranışı üzerinde daha büyük bir etkisi olmuştur. Bezelye proteini formülasyonlarının termal stabilitesi, spirulina içerenlerden daha iyi performans göstererek hidrojelatin termal davranışında protein türünün önemini vurgulamıştır. Dinamik salınım analizleri, bezelye proteini ile desteklenen hidrojelatin yüksek depolama ve kayıp modülleri sergilediğini ve bunun da gelişmiş stabilite ve elastikiyete işaret ettiğini göstermiştir. Moleküler yerleştirme analizleri, hidrojelatin stabilitesinin öncelikle bezelye proteini, jelatin ve spirulina dahil olmak üzere pektin ve proteinler arasındaki etkileşimlere bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Bezelye proteini ve pektin arasındaki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı, kompleksin korunmasında çok önemli bir rol oynamıştır. Sonuçlar, bezelye proteini ve spirulina bazlı ikili hidrojelatin 3D baskı teknolojisinde ve yağ ikamesi olarak kullanılmak üzere önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu hidrojelatin, besleyici ve işlevsel özellikleriyle yenilikçi gıda ürünlerinin ve ambalajlama sistemlerinin geliştirilmesini kolaylaştırabilir.

### KAYNAKLAR

- Alavi, F., Ciftci, O. N. (2023). Superlight macroporous aerogels produced from cold-set egg white protein hydrogels show superior oil structuring capacity. *Food Hydrocolloids*, 136, 108180. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108180>
- Anvari, M., Chung, D. (2016). Dynamic rheological and structural characterization of fish gelatin-Gum Arabic coacervate gels cross-linked by tannic acid. *Food Hydrocolloids*, 60, 516-524. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.028>

- Bernaerts, T. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., Van Loey, A. M. (2019). The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnology Advances*, 37(8), 107419. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419>
- Cai, W. D., Qiu, W. Y., Ding, Z. C., Wu, L. X., Yan, J. K. (2019). Conformational and rheological properties of a quaternary ammonium salt of curdlan. *Food Chemistry*, 280, 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.059>
- Cao, Y., Li, Z., Fan, X., Liu, M., Han, X., Huang, J., Xiong, Y. L. (2022). Multifaceted functionality of L-arginine in modulating the emulsifying properties of pea protein isolate and the oxidation stability of its emulsions. *Food Function*, 13(3), 1336-1347. <https://doi.org/10.1039/D1FO03372G>
- Cebrián-Lloret, V., Martínez-Abad, A., López-Rubio, A., Martínez-Sanz, M. (2024). Exploring alternative red seaweed species for the production of agar-based hydrogels for food applications. *Food Hydrocolloids*, 146, 109177. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109177>
- De Berardinis, L., Plazzotta, S., Manzocco, L. (2023). Optimising soy and pea protein gelation to obtain hydrogels intended as precursors of food-grade dried porous materials. *Gels*, 9(1), 62. <https://doi.org/10.3390/gels9010062>
- dos Santos, M., da Rocha, D. A. V. F., Bernardinelli, O. D., Oliveira Júnior, F. D., de Sousa, D. G., Sabadini, E., Pollonio, M. A. R. (2022). Understanding the performance of plant protein concentrates as partial meat substitutes in hybrid meat emulsions. *Foods*, 11 (21), 3311. <https://doi.org/10.3390/foods11213311>
- Ferreira de Freitas, R., Schapira, M. (2017). A systematic analysis of atomic protein-ligand interactions in the PDB. *Medchemcomm* 8 (10), 1970–1981. doi:10.1039/c7md00381a
- Ghanbari, M., Mortazavian, A. M., Ghasemi, J. B., Mohammadi, A., Hosseini, H. Nevestani, T. R. (2017). Formulation and development of a new prebiotic cereal-based dairy dessert: rheological, sensory and physical attributes. *Food Science and Technology Research*, 23(5), 637-649. DOI: 10.3136/fstr.23.637
- Ghica, M. V., Hirjău, M., Lupuleasa, D., Dinu-Pîrvu, C. E. (2016). Flow and thixotropic parameters for rheological characterization of hydrogels. *Molecules*, 21(6), 786. <https://doi.org/10.3390/molecules21060786>
- Gupta, B., Tummalapalli, M., Deopura, B. L., Alam, M. S. (2014). Preparation and characterization of in-situ crosslinked pectin-gelatin hydrogels. *Carbohydrate polymers*, 106, 312-318. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.019>
- Hilal, A., Florowska, A., Wroniak, M. (2023). Binary hydrogels: Induction methods and recent application progress as food matrices for bioactive compounds delivery—A bibliometric review. *Gels*, 9(1), 68. <https://doi.org/10.3390/gels9010068>
- Hou, J. J., Guo, J., Wang, J. M., He, X. T., Yuan, Y., Yin, S. W., Yang, X. Q. (2015). Edible double-network gels based on soy protein and sugar beet pectin with hierarchical microstructure. *Food Hydrocolloids*, 50, 94-101. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2015.04.012
- Ishwarya S, P., Nisha, P. (2022). Advances and prospects in the food applications of pectin hydrogels. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (16), 4393-4417. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1875394>
- Kan, X., Zhang, S., Kwok, E., Chu, Y., Chen, L., Zeng, X. (2024). Granular hydrogels with tunable properties prepared from gum Arabic and protein microgels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132878. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132878>
- Klein, M., Poverenov, E. (2020). Natural biopolymer-based hydrogels for use in food and agriculture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2337-2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10274>
- Koshenaj, K., Ferrari, G. (2024). A Comprehensive Review on Starch-Based Hydrogels: From Tradition to Innovation,

- Opportunities, and Drawbacks. *Polymers*, 16(14), 1991. <https://doi.org/10.3390/polym16141991>
- Lapomarda, A., Cerqueni, G., Geven, M. A., Chiesa, I., De Acutis, A., De Blasi, M., Vozzi, G. (2021). Physicochemical Characterization of Pectin-Gelatin Biomaterial Formulations for 3D Bioprinting. *Macromolecular Bioscience*, 21(9), 2100168. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100168>
- Lenie, M. D., Ahmadzadeh, S., Van Bockstaele, F., Ubeyitogullari, A. (2024). Development of a pH-responsive system based on starch and alginate-pectin hydrogels using coaxial 3D food printing. *Food Hydrocolloids*, 153, 109989. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109989>
- Li, C., Xu, Y., Zhang, Y., Shen, Y., Deng, X., Wang, F. (2024). Novel bigels based on walnut oil oleogel and chitosan hydrogel: Preparation, characterization, and application as food spread. *International Journal of Biological Macromolecules*, 260, 129530. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129530>
- Liu, L., Tian, W., Chen, M., Huang, Y., Xiao, J. (2023). Oral sensation and gastrointestinal digestive profiles of bigels tuned by the mass ratio of konjac glucomannan to gelatin in the binary hydrogel matrix. *Carbohydrate Polymers*, 312, 120765. DOI: 10.1016/j.carbpol.2023.120765
- Martins, A. J., Silva, P., Maciel, F., Pastrana, L. M., Cunha, R. L., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A. (2019). Hybrid gels: Influence of oleogel/hydrogel ratio on rheological and textural properties. *Food Research International*, 116, 1298-1305. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.019>
- Melzener, L., Spaans, S., Hauck, N., Pötgens, A. J., Flack, J. E., Post, M. J., Doğan, A. (2023). Short-Stranded Zein Fibers for Muscle Tissue Engineering in Alginate-Based Composite Hydrogels. *Gels*, 9(11), 914. <https://doi.org/10.3390/gels9110914>
- Mirzaei, A., Esmkhani, M., Zallaghi, M., Nezafat, Z., Javanshir, S. (2023). Biomedical and environmental applications of carrageenan-based hydrogels: a review. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(5), 1679-1705. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02726-5>
- Mo, Q., Huang, L., Sheng, Y., Wei, Z., Zhang, S., Li, Y., Xue, M. (2024). Crosslinking strategy and promotion role of cellulose as a composite hydrogel component for three-dimensional printing—A review. *Food Hydrocolloids*, 110079. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110079>
- Morris, G. A., Castile, J., Smith, A., Adams, G. G., Harding, S. E. (2010). The effect of different storage temperatures on the physical properties of pectin solutions and gels. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2670-2673. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.013>
- Rosti, M. E., Takagi, S. (2021). Shear-thinning and shear-thickening emulsions in shear flows. *Physics of Fluids*, 33(8). <https://doi.org/10.1063/5.0063180>
- Sahagún, M., Bravo-Núñez, Á., Báscones, G., Gómez, M. (2018). Influence of protein source on the characteristics of gluten-free layer cakes. *LWT*, 94, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.014>
- Said, N. S., Olawuyi, I. F., Lee, W. Y. (2023). Pectin hydrogels: Gel-forming behaviors, mechanisms, and food applications. *Gels*, 9(9), 732. <https://doi.org/10.3390/gels9090732>
- Sedighi, M., Shrestha, N., Mahmoudi, Z., Khademi, Z., Ghasempour, A., Dehghan, H., Shahbazi, M. A. (2023). Multifunctional self-assembled peptide hydrogels for biomedical applications. *Polymers*, 15(5), 1160. <https://doi.org/10.3390/polym15051160>
- Shi, K., Wang, W., Sun, J., Jiang, C., Hao, J. (2024). A rapid one-step affinity purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal of Chromatography A*, 1720, 464801. DOI: 10.1016/j.chroma.2024.464801
- Smith, S. O., Eilers, M., Song, D., Crocker, E., Ying, W., Groesbeek, M., Aimoto, S. (2002). Implications of threonine hydrogen bonding in the glycophorin A transmembrane helix dimer. *Biophysical Journal*, 82(5), 2476-2486.



- [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75590-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75590-2)
- Stojkov, G., Niyazov, Z., Picchioni, F., Bose, R. K. (2021). Relationship between structure and rheology of hydrogels for various applications. *Gels*, 7(4), 255. DOI: 10.3390/gels7040255
- Swe, M. T. H., Asavapichayont, P. (2018). Effect of silicone oil on the microstructure, gelation and rheological properties of sorbitan monostearate–sesame oil oleogels. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(5), 485–497. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.04.006>
- Tanwar, M., Gupta, R. K., Rani, A. (2024). Natural gums and their derivatives based hydrogels: in biomedical, environment, agriculture, and food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 44(2), 275–301. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2157702>
- Varela, M. S., Palacio, M. A., Navarro, A. S., Yamul, D. K. (2023). Structural and functional properties and digital image texture analysis of gelatin, pectin, and carrageenan gels with honey addition. *Journal of Texture Studies*, 54(5), 646–658. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12774>
- Wang, L., Zhang, H. J., Wang, X., Zhao, W., Yan, W., Zhang, F., You, X. (2023). Edible hydrogel from gelatin and alginate as functional low-calorie noodle. *Journal of Applied Polymer Science*, 140(2), e53281. <https://doi.org/10.1002/app.53281>
- Wang, M., Yin, Z., Sun, W., Zhong, Q., Zhang, Y., Zeng, M. (2023b). Microalgae play a structuring role in food: Effect of spirulina platensis on the rheological, gelling characteristics, and mechanical properties of soy protein isolate hydrogel. *Food Hydrocolloids*, 136, 108244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108244>
- Woldeyes, M. A., Qi, W., Razinkov, V. I., Furst, E. M., Roberts, C. J. (2020). Temperature dependence of protein solution viscosity and protein–protein interactions: insights into the origins of high-viscosity protein solutions. *Molecular Pharmaceutics*, 17(12), 4473–4482. [doi/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00552](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00552)
- Wu, Y., Cui, W., Eskin, N. A. M., Goff, H. D. (2009). An investigation of four commercial galactomannans on their emulsion and rheological properties. *Food Research International*, 42(8), 1141–1146. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.05.015>
- Xu, S. Q., Du, Y. N., Zhang, Z. J., Yan, J. N., Sun, J. J., Zhang, L. C., Wu, H. T. (2024). Gel properties and interactions of hydrogels constructed with low acyl gellan gum and puerarin. *Carbohydrate Polymers*, 326, 121594. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121594>
- Yan, J., Li, S., Chen, G., Ma, C., McClements, D. J., Liu, X., Liu, F. (2023). Formation, physicochemical properties, and comparison of heat-and enzyme-induced whey protein-gelatin composite hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 137, 108384. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108384>
- Yang, X., Li, A., Li, D., Guo, Y., Sun, L. (2021). Applications of mixed polysaccharide-protein systems in fabricating multi-structures of binary food gels—A review. *Trends in Food Science and Technology*, 109, 197–210. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.002>
- Yin, L., Fu, S., Wu, R., Wei, S., Yi, J., Zhang, L. M., Yang, L. (2020). Chain conformation of an acidic polysaccharide from green tea and related mechanism of  $\alpha$ -amylase inhibitory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1124–1132. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.125>
- Yu Deng, H., Ang Zheng, Z., Xie, A. M., Lin Chen, Z., Cao, P. (2024). Preparation and performance characterization of temperature-sensitive JP-3 kerosene gel propellant. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics*, 49(1), e202300156. <https://doi.org/10.1002/prep.202300156>
- Zha, F., Rao, J., Chen, B. (2021). Plant-based food hydrogels: Constitutive characteristics, formation, and modulation. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 56, 101505. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101505>
- Zhang, D., Chen, D., Campanella, O. H. (2024). Effect of pH on the gelling properties of pea

protein-pectin dispersions. *Food Hydrocolloids*, 151, 109731. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.109731>

Zhang, D., Chen, D., Patel, B., Campanella, O. H. (2022)b. Pectin as a natural agent for reinforcement of pea protein gel. *Carbohydrate Polymers*, 298, 120038. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120038>

Zhang, Q., Fan, W., Shi, Y., Tu, Z., Hu, Y., Zhang, J. (2023). Interaction between soy protein isolate/whey protein isolate and sucrose ester during microencapsulation: Multi-spectroscopy and molecular docking. *LWT*, 188, 115363. DOI: [10.1016/j.lwt.2023.115363](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115363)

Zhang, X., Wang, C., Qi, Z., Zhao, R., Wang, C., Zhang, T. (2022). Pea protein based nanocarriers for lipophilic polyphenols: Spectroscopic analysis, characterization, chemical stability, antioxidant and molecular docking. *Food Research International*, 160, 111713. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111713>

Zhou, M., Bi, J., Chen, J., Wang, R., Richel, A. (2021). Impact of pectin characteristics on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of water-soluble pectins extracted from different sources. *Food Hydrocolloids*, 112, 106350. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106350>

**YEŞİL SARIMSAK (*ALLIUM SATIVUM* L.) YAPRAKLARINDA BULUNAN  
FENOLİK VE ANTİOKSİDAN MADDELERİN EKSTRAKSİYON  
KOŞULLARININ YÜZEY YANIT YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU**

**Hatice Aybüke KARAOĞLAN\***

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sivas, Türkiye

Geliş/Received: 05.08.2024; Kabul /Accepted: 25.09.2024; Online baskı /Published online: 28.09.2024

Karaoğlan H. A. (2024). Yeşil sarımsak (*Allium sativum* L.) yapraklarında bulunan fenolik ve antioksidan maddelerin ekstraksiyon koşullarının yüzey yanıt yöntemi ile optimizasyonu. GIDA (2024) 49 (5) 920-933 doi: 10.15237/gida.GD24080

Karaoğlan H. A. (2024). Optimization of phenolic and antioxidant compounds extraction conditions in green garlic (*Allium sativum* L.) leaves by surface response methodology. GIDA (2024) 49 (5) 920-933 doi: 10.15237/gida.GD24080

**ÖZ**

Günümüzde sağlıklı yaşam tarzını benimseyen insan sayısındaki artış doğal biyoaktif bileşiklere ve bu bileşikleri içeren ürünlere olan talebin artmasına neden olmuştur. Bu çalışmada, iyi bir biyoaktif bileşen kaynağı olan yeşil sarımsak yapraklarından (*Allium sativum* L.), en yüksek düzeyde toplam fenolik madde (TFM) ve antioksidan madde (AM) ekstraksiyonu için gerekli optimum koşullar Yüzey Yanıt Yöntemi (YYY) kullanılarak belirlenmiştir. Araştırmada bağımsız değişken olarak; etanol konsantrasyonu (% 60-80), uygulama süresi (15-45 dk.) ve ürün/solvent (Ü/S) oranı (1/50-1/100) belirlenmiştir. Yanıt olarak, TFM ve AM analizleri seçilmiştir. Optimizasyon çalışması sonuçları, yeşil sarımsak yapraklarından en yüksek verimde TFM ve AM ekstraksiyonu sağlamak için optimum parametrelerin; % 69.70 etanol, 15 dk. uygulama süresi ve 1/50 Ü/S oranı olduğunu göstermiştir. Bu koşullar altında, ekstrakte edilen örneklerin deneysel TFM ve AM değerleri sırasıyla  $15.18 \pm 1.4$  mg GAE/g KM ve  $88.16 \pm 1.18$  olarak bulunmuştur. Deneysel değerlerin YYY ile tahmin edilen değerlerle yakın bir uyum içerisinde olması geliştirilen modellerin uygunluğunu kanıtlamıştır.

**Anahtar kelime:** *Allium sativum* L., Box Behnken, antioksidan madde, toplam fenolik madde

**OPTIMIZATION OF PHENOLIC AND ANTIOXIDANT COMPOUNDS  
EXTRACTION CONDITIONS IN GREEN GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L.)  
LEAVES BY SURFACE RESPONSE METHODOLOGY**

**ABSTRACT**

The demand for natural bioactive compounds and products that contain these compounds has increased because of the desire to live healthier. The Response Surface Methodology (RSM) was used to find the optimum parameters for getting the highest level of total phenolic compounds (TPC) and antioxidant compounds (AC) out of green garlic leaves (*Allium sativum* L.). In this study the ethanol concentration (60–80%), application time (15–45 min.), and product/solvent (P/S) ratio (1/50–1/100) were selected as independent variables. As responses, TPC and AC analyses were used. The study found that 69.70% ethanol, 15 min., and 1/50 U/S ratio were the optimum conditions. Under

\* Sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: akaroglan@cumhuriyet.edu.tr

☎: (+90) 346 487 0000

Hatice Aybüke Karaoğlan; ORCID no: 0000-0002-0790-186X

these conditions, the experimental TPC and AC values of the extracted samples were found to be  $15.18 \pm 1.4$  mg GAE/g DM and  $88.16 \pm 1.18\%$ , respectively. The fact that the experimental values were very close to RSM's expected values demonstrated that the models were suitable.

**Keywords:** *Allium sativum* L., Box Behnken, antioxidant compounds, total phenolic compounds

### GİRİŞ

Son yıllarda, giderek artan sayıda insan doğal ve sağlıklı yaşam tarzı isteğinde olup, diyetinde özellikle doğal biyoaktif bileşikleri içeren bitkisel maddelere yer verme eğilimindedir. Bu bitkisel maddeler güçlü antioksidan aktivitelerinin yanı sıra, yan etkilerinin olmaması ve ekonomik uygulanabilirliği nedeniyle de araştırmalara konu olmaktadır (Singh vd., 2012).

Sarımsak (*Allium sativum* L.), *Allium* türüne bağlı, sebze, baharat ve tıbbi ot olarak yaygın olarak tüketilen bir bitkidir (Bonaccorsi vd., 2008). Sarımsak, Doğu, Güney ve Güneydoğu Asya, Orta Doğu, Kuzey Afrika ve Güney Avrupa'da sıklıkla yetiştirilmekte ve birçok alanda kullanılmaktadır (Fратиanni vd., 2016). Ülkemizde yeşil sarımsak üretimi 2023 yılında 47487 ton iken, 2024 yılında 54127 tona ulaşmıştır (Anonymous, 2024). Diyetlerde genellikle kuru veya taze sarımsağın baş veya dişleri yaygın kullanılırken, yeşil sarımsak yaprakları da tüketilmektedir. Yeşil sarımsak, soğan oluşmadan önce erken aşamada hasat edilen, yumuşak yapraklı genç sarımsak olarak tanımlanmakta ve pişirilerek veya taze şekilde salata ve yemeklerde tüketilmektedir (Akan vd., 2019).

Sarımsak kükürt ihtiva eden bileşiklerden (alicin, alliin ve ajoene) oluşan uçucu yağlar, enzimler (alinaz, peroksidaz ve mirasinaz), karbohidratlar (sakkaroz, glikoz), mineraller, aminoasitler, A, B1, B2, Niasin ve C vitamini gibi 200 den fazla kimyasal bileşiğe sahiptir (Ayaz vd., 2007). İçerisinde yer alan organik sülfidler, saponinler, fenolik bileşikler ve polisakkaritler gibi çeşitli biyoaktif bileşikler nedeniyle sağlık açısından pek çok faydası bulunmaktadır (Lu vd., 2011). Hem fenolik hem de organosülfür bileşikler *Allium* türlerinde antioksidan aktiviteye katkıda bulunan biyoaktif bileşenlerdir. Son yıllarda, çok sayıda çalışma sarımsağın antioksidan, kardiyovasküler koruyucu, antikarsinogen, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antidiyabetik, antiobezite ve antibakteriyel özellikler de dahil olmak üzere

birçok biyolojik fonksiyonlarını ortaya koymuştur (Ayaz vd., 2007; Strati vd., 2018). Sarımsak antik çağlardan beri, ateş, bağırsak kurtları, baş ağrıları ve dizanteri gibi hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır (Fратиanni vd., 2016).

Doğal antioksidanlar, gıda takviyeleri ve fonksiyonel gıdalarda insan ve hayvan sağlığı üzerinde istenmeyen etkilere neden olabilen sentetik antioksidanların yerine tercih edilmektedir (Arruda vd., 2017). Sahip olduğu biyoaktif maddeler nedeniyle sarımsak gıda olarak tüketilmesinin yanısıra biyoaktif maddelerin ekstrakte edilmesi ile ilaç ve kozmetik endüstrileri gibi birçok farklı endüstri sektöründe de kullanılabilir.

Ekstraksiyon, bitki matrislerinden fenolik bileşiklerin alınması ve saflaştırılmasında kullanılan ilk ve en önemli adımlardan biridir (Arruda vd., 2017). Uygun bir çözücü ile ekstraksiyon işlemi, çok çeşitli bitkisel matrislerden yüksek fenolik içerikli özütler elde etmek için kullanılan en yaygın tekniktir. Bu amaçla kullanılan tek bir yol veya ekstraksiyon koşulu bulunmamaktadır. Biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için genellikle su, metanol, etanol ve aseton kullanılmaktadır. Ekstraksiyon tekniği, sıcaklık, süre, tip ve solvent konsantrasyonu, ürün/solvent (Ü/S) oranı ve ekstraksiyon döngüleri, tek başına ve/veya birarada ekstraksiyon verimliliğini etkileyen faktörler arasındadır (Simić vd., 2016; Chebbi vd., 2024). Çözücünün ve farklı antioksidan bileşiklerin polaritesi, ekstraksiyonun verimliliğini ve elde edilen ekstraktların aktivitesini etkilemektedir (González-Montelongo vd., 2010). Ayrıca kullanılan çözücünün konsantrasyonu da ekstraksiyonu etkilemektedir (Simić vd., 2016; Arruda vd., 2017; Erol vd., 2022). Çözücü konsantrasyonundaki su oranının artırılması, glikozitler gibi polar bileşiklerin matristen çıkarılmasını kolaylaştırırken, tersine, flavonlar ve flavonoller gibi belirli flavonoid grupları, heterosikliklik kombinasyonların karmaşıklığı

nedeniyle genellikle sağlam bileşikler olarak değil, ağlikonlarının formuna göre karakterize edilmektedir (Tsao ve Deng, 2004). Ekstraksiyon çalışmalarında bu faktörlerin bireysel ve/veya birlikte ele alınarak incelenmesinde fayda vardır.

Yanıt yüzeyi yöntemi (YYY), deneysel tasarımıla ilgili olarak elde edilen deneysel verilerin ampirik modellerle ifade edilmesine dayalı, birden fazla bağımsız faktörün ve bu faktörlerin etkileşimlerinin etkilerini değerlendirmek için kullanılan etkili bir istatistiksel tekniktir (Durukan vd., 2024). Bu yöntem, geleneksel optimizasyon yöntemlerine göre daha az sayıda deney gerektirmekte, verileri yorumlamak için istatistiksel bir temel sunmakta, değerkenler arasındaki etkileşimi ortaya koymakta, ayrıca daha az zahmetli ve zaman alıcı olarak tanımlanmaktadır (Kumar vd., 2017; Durukan vd., 2023; Karaoğlan ve Aktas, 2023). Bu sağladığı avantajlar nedeniyle YYY birçok bitki kaynaklı materyalin sahip oldukları fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda başarıyla kullanılmıştır (Singh vd., 2012; Arruda vd., 2017; Zhou vd., 2019; Erol vd., 2022).

Yapılan detaylı araştırmada şimdiye kadar yeşil sarımsak yapraklarından fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonu için YYY kullanılarak yapılmış bir optimizasyon çalışmasına rastlanılmamıştır. Bu çalışmada, fenolik ve antioksidan maddeler açısından iyi bir kaynak olan yeşil sarımsak bitkisinden en yüksek verimde fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için YYY kullanılarak optimum koşullar araştırılmıştır. Çalışmada, bağımsız

değerkenler olarak etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve /S oranı belirlenmiştir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada 39.707950, 36.909753 enlem ve boylamında yer alan Serpincik, Sivas (Türkiye) bölgesinde yetişen sarımsak (*Allium sativum* L.)’un yeşil yaprakları kullanılmıştır. Taze şekilde toplanan yapraklar plastik poşetlerde laboratuvara getirilmıştir. Denemeler Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği run Geliştirme ve Araştırma laboratuvarında gerekleştirilmıştir.

### Yöntem

#### *Deney Düzeneğinin Kurulması*

Çalışmada, yeşil sarımsak yapraklarında yer alan Toplam fenolik madde (TFM) ve Antioksidan madde (AM) ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu yapılmıştır. Bağımsız değerken olarak; etanol konsantrasyonu (% 60-100), uygulama süresi (15-45 dk.) ve /S oranı (1/50-1/100) şeklinde belirlenmiştir (izelge 1). Daha önceli yapılan çalışmalarda TFM ve AM ekstraksiyonunda başarılı sonuçlar veren (Simi vd., 2016; Arruda vd., 2017; Erol vd., 2022), ayrıca evre dostu ve ucuz olması nedeniyle ozucu olarak etanol kullanılmıştır (Alide vd., 2020; Chebbi vd., 2024). Deney düzeneği, YYY içerisinde Box-Behnken deney tasarımı (BBD) kullanılarak üç bağımsız değerkenli ve üç seviyeli, merkez noktada 3 tekrar olacak şekilde 30 deney olarak oluşturulmuştur (izelge 2). BBD tasarımında, yanıt olarak; TFM ve AM analizleri seçilmiştir. Tüm analizler üç tekrarlı gerekleştirilmıştir.

Çizelge 1. Box-Behnken deneme tasarımında kullanılan bağımsız değerkenler ve seviyeleri  
Table 1. Independent variables and their levels used in the Box-Behnken experimental design

Bağımsız değerken/ Independent variable	Kodlanmış Seviyeler/ Coded Levels		
	-1	0	1
Etanol konsantrasyonu (%)/ Ethanol Concentration (%)	60	80	100
Uygulama süresi (dk.)/ Application time (min.)	15	30	45
/S oranı/P/S ratio	1/50	1/75	1/100

\*Kısaltmalar; /S: run/solvent  
Abbreviations; P/S: product/solvent

## Yeşil sarımsak yapraklarındaki fenolik ve antioksidan maddeler

Çizelge 2. Box-Behnken deney tasarımı  
Table 2. Box-Behnken experimental design

Örnek No/sample number	Bağımsız değişkenler ve seviyeleri/ Independent variables and codes		
	Etanol Konsantrasyonu (%)/ Ethanol Concentration (%)	Uygulama süresi (dk.)/ Application time (min.)	Ü/S oranı/ P/S ratio
1	80	30	75
2	60	30	100
3	60	30	100
4	100	30	100
5	60	15	75
6	80	15	100
7	60	45	75
8	80	30	75
9	100	45	75
10	80	15	50
11	60	15	75
12	80	45	100
13	100	15	75
14	100	30	50
15	80	30	75
16	100	30	50
17	80	45	50
18	60	30	50
19	80	45	50
20	100	30	100
21	80	30	75
22	60	45	75
23	80	45	100
24	100	15	75
25	80	15	50
26	80	30	75
27	80	30	75
28	60	30	50
29	100	45	75
30	80	15	100

\*Kısaltmalar; Ü/S: ürün/solvent  
Abbreviations; P/S: product/solvent

### Örneklerin Hazırlanması

Sarımsak örneklerinin yeşil yaprakları koparılmış ve yıkama işlemi yapılmıştır. Küçük parçalar halinde kesilen yeşil sarımsak yaprakları, 50°C'ya ayarlanan etüvde (Memmert, Almanya) nem değeri yaklaşık % 9'a (Shimadzu, MOC63u) düşünceye kadar bekletilmiştir. Kurutulmuş örnekler kahve öğütücünde (Sinbo, SCM-2914, Çin) geçirildikten sonra gözenek aralığı 300 µm ve 150 µm olan eleklerden (RETSCH, S200 basic, Hann, Almanya) sırasıyla geçirilmiş ve elek altında kalan kısım analizlerde kullanılmıştır. Analizlerin gerçekleştirileceği zamana kadar örnekler plastik poşetlerde +4°C'de saklanmıştır.

### Örneklerin Ekstraksiyonu

Her bir örnek Çizelge 2'de belirtilen etanol konsantrasyonu ve Ü/S (w/v) oranında Falcon tüpü içerisinde hazırlanmış ve aynı çizelgede belirtilen ekstraksiyon süresi boyunca mekanik çalkalayıcıda (Memmert WNB 22) bekletilmiştir. Ekstraksiyon süresinin tamamlanmasından sonra, süspansiyon Whatman No.1 filtre kağıdından süzülüş ve ekstraktlar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

### Toplam Fenolik Madde Analizi

TFM tayini (Cemeroğlu, 2010)'un önerdiği yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

Analizde 10 kat seyreltilmiş Folin-Ciocalteu ayracı ve %20'lik doymuş Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi kullanılmıştır. Doymuş Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlanırken; az miktarda saf su içerisinde çözündürülen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 dakika Bunsen alevinde kaynatıldıktan sonra bir gece buzdolabında bekletilip süzölmüş, ardından süzöntü planlanan hacime kadar seyreltilmiştir.

Örneklerin TFM hesaplamalarında standart gallik asit eğrisi kullanılmıştır. Standart eğri hazırlamak amacıyla 500 µg/mL gallik asit stok çözeltisi hazırlanmış, bu stok çözeltiden farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200, 300, 400 µg/mL) hazırlanarak spektrofotometrede (Optima, SP-3000 Plus, Japonya) absorbans değerleri ölçölmüştür. Kullanılan gallik asit kalibrasyon eğrisinin denklemi  $Y=0.0116x$  olup R<sup>2</sup> değeri 0.99'dur. Örneklere ait TFM değerleri mg gallik asit eşdeğeri gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru madde (KM) olarak ifade edilmiştir.

Analiz sırasında tüplerin içerisine sırasıyla 2400 µL saf su, 40 µL örnek ve 200 µL Folin-Ciocalteu ayracı eklenmiş, ardından tüpler karıştırılmıştır. Tüpler, 15 dk. süreyle karanlık bir ortamda bekletildikten sonra üzerine sırasıyla 600 µL doymuş Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve 760 µL saf su eklenip tekrar karıştırılmıştır. Örnekler, 30 dk. karanlık bir ortamda bekletilmesinin ardından spektrofotometrede (Optima, SP-3000 Plus, Japonya) 765 nm'de absorbansları ölçölmüştür.

#### Antioksidan Madde Analizi

Ekstraktların antioksidan miktarları, Türkmen vd. (2005) tarafından önerilen 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemine göre belirlenmiştir. Ekstraktlardan 50 µL alınarak üzerine 1950 µL metanolde hazırlanmış 6x10<sup>-5</sup> M DPPH radikali eklenmiştir. Vorteks yardımıyla karıştırıcıdan geçirildikten sonra, karışım oda sıcaklığında 60 dk. süreyle karanlıkta bekletilmiştir. Sürenin bitiminde spektrofotometrede (Optima, SP-3000 Plus, Japonya) 517 nm'de metanole karşı absorbans değerleri belirlenmiştir. Örneklere ait AM değerleri, aşağıdaki eşitlikten faydalanılarak hesaplanmıştır. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır.

$$AM (\%) = \frac{abs_{kontrol} - abs_{örnek}}{abs_{kontrol}} \times 100 \quad (1)$$

#### Optimizasyon ve Validasyon

Örneklerin TFM ve AM analizleri gerçekleştirildikten sonra optimizasyon çalışmasına geçilmiştir. YYY içerisinde örneklerin hem TFM hem de AM değerleri en yüksek elde edilen, optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Ayrıca bu koşullar ampirik ikinci dereceden polinom regresyon modeline uyarlanmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

Burada Y; yanıt (TFM ve AM),  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  ve  $\beta_{ij}$  sırasıyla intercept, doğrusal, ikinci dereceden ve interaksiyon terimleri için regresyon katsayılarıdır.  $X_i$  ve  $X_j$  bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. Validasyon işlemi için belirlenen optimum koşullarda ekstraksiyon işlemi tekrar edilmiş ve bu örneklere ait TFM ve AM analizleri tekrar gerçekleştirilmiştir. Ardından optimizasyon ile tahmin edilen verilerle, deneysel verilerin birbirine yakınlığı belirlenmiştir.

#### İstatistik Analizi

Çalışma planı Minitab 20.0 (State College, PA) programı kullanılarak YYY içerisindeki BBD ile oluşturulmuştur. Farklı ekstraksiyon parametrelerinin örneklerin TFM ve AM üzerine etkisi, varyans analizi (ANOVA) ile incelenmiştir.

Modelin yeterliliği, belirlilik katsayısı (R<sup>2</sup>) ve düzeltilmiş belirlilik katsayısı (adj-R<sup>2</sup>) terimleri ile ifade edilirken, regresyon katsayısının anlamlılığını kontrol etmek için F ve P değerleri kullanılmıştır. Son olarak, kurulan modelin yeterliliğini belirlemek amacıyla deneysel ve tahmin edilen değerler karşılaştırılmıştır. Model ile tahmin edilen değerler ve deneysel değerler arasında istatistikteki önemli bir farklılık olup olmadığı MINITAB 20.0 (State Collge, PA)'de % 95 güven aralığında iki örnek t testi ile değerlendirilmiştir.

#### BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışma kapsamında farklı bağımsız değişkenlerin (etanol konsantrasyonu, uygulama süresi, Ü/S oranı) yeşil sarımsak yaprakları TFM ve AM üzerine etkisi YYY ile incelenmiştir. İncelenen koşullar ve elde edilen veriler YYY içerisinde analiz edilerek her bir yanıt için uygun fonksiyonlar belirlenmiştir.

**Örneklerin Toplam Fenolik Madde Değerleri**

Farklı ekstraksiyon koşullarında tutulan örneklerin TFM içerikleri Çizelge 3’de verildiği gibi 1.37 mg GAE/g KM ile 16.39 mg GAE/g KM arasında değişmektedir. Optimizasyon çalışmalarında bağımsız değişkenlerin seviyeleri geniş bir aralıkta belirlendiği için yanıtların değerleri de geniş bir aralıkta çıkabilmektedir. Düşük TFM değerleri ekstraksiyon koşullarının uygun olmadığını gösterirken, tam tersi yüksek TFM değerleri ekstraksiyon koşullarının uygunluğunu göstermektedir. Dolayısıyla çalışmada elde edilen yüksek TFM değerlerini diğer çalışmalar ile kıyasladığımızda; değerlerin farklı bölgelerden tedarik edilen sarımsaklarda

15.61-16.39 mg GAE/g KM değerlerini kaydeden Lu vd., (2011) ile benzerlik göstermektedir. Çalışmada belirlenen TFM değerleri yüksek değerler olup, yeşil sarımsak yaprakların iyi bir fenolik kaynak olduğunu, dolayısıyla gıda takviyeleri ve ilaçlar için iyi biyoaktif bileşen kaynağı olabileceğini göstermektedir. Polifenollerin oksidatif strese karşı hücre zarları, hücresel bileşenleri ve nükleik asitleri korurken, aynı zamanda kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği de bilinmektedir (Fratianni vd., 2016). Bununla birlikte, bitki kaynaklı fenolikler ayrıca antikarsinogen ve apoptozis indükleyici özellikleri için önemli bir mekanizma olabilecek pro-oksidan etki gösterebilir (Szychowski vd., 2018).

Çizelge 3. Yeşil sarımsak yaprağı örneklerinin ekstraksiyon sonucu elde edilen TFM ve AM değerleri

*Table 3. TFC and AC values obtained as a result of extraction of green garlic leaf samples*

Örnek kodu/ sample number	Etanol kons./ Ethanol Concentration (%)	Uygulama süresi (dk.)/ Application time (min.)	Ü/S oranı/ P/S ratio	TFM (mg GAE/g KM)/ TPC mg GAE/g DM	AM/AC (%)
1	80	30	75	13.74	77.88
2	60	30	50	12.80	67.45
3	80	45	50	13.11	77.41
4	80	45	50	11.98	75.55
5	100	45	75	3.82	46.11
6	60	45	75	14.19	80.69
7	100	30	50	1.43	39.10
8	60	30	50	14.54	81.00
9	80	15	50	14.34	84.42
10	60	15	75	12.06	77.88
11	100	45	75	4.88	50.16
12	80	30	75	13.13	77.73
13	100	30	100	4.06	49.84
14	80	30	75	13.74	78.04
15	100	15	75	1.37	38.94
16	80	30	75	13.89	78.97
17	80	15	100	13.79	78.04
18	80	15	100	12.17	77.88
19	60	15	75	13.43	77.10
20	100	30	50	2.77	40.03
21	80	45	100	15.18	88.94
22	100	15	75	1.68	38.79
23	60	30	100	14.07	84.58
24	80	30	75	14.35	85.83
25	100	30	100	4.46	50.16
26	80	45	100	15.42	88.16
27	80	30	75	14.50	86.14
28	60	45	75	12.82	77.73
29	60	30	100	14.20	84.27
30	80	15	50	16.39	89.10

\*Kısaltmalar; TFM; toplam fenolik madde, AM; antioksidan madde, Ü/S: ürün/solvent  
Abbreviations; TPC; total phenolic content, AC; antioxidant compounds, P/S: product/solvent



Çizelge 4'te verilen sonuçlar, çok düşük  $P$  değeri ( $P < 0.001$ ) ve yüksek  $F$  değeri (97.43) oluşturulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir. Çizelge 4'ten anlaşıldığı gibi, TFM verimi üzerinde en büyük etkiye sahip olan faktör etanol konsantrasyonudur. Ayrıca, ikinci

dereceden terimlerden etanol konsantrasyonu\*etanol konsantrasyonu ve ikili interaksyondan uygulama süresi\*Ü/S oranının ilişkisi de örneklerin TFM değerleri üzerine önemlidir ( $P < 0.001$ ) (Çizelge 3).

Çizelge 4. Yeşil sarımsak yaprağı örneklerinin TFM değerlerine ait ANOVA ve regresyon model özetleri

Table 4. ANOVA and regression model summaries of TPC values of green garlic leaf samples

Kaynak/ Sources	Serbestlik derecesi / Degree of freedom	Kareler toplamı/ Sum of squares	Kareler ortalaması/ Mean of squares	F değeri/ F value	P değeri/P value
Model /Model	9	701.821	77.980	97.43	0.000
Doğrusal/ Linear	3	441.922	147.307	184.05	0.000
Etanol konsantrasyonu/ Ethanol concentration ( $X_1$ )	1	437.301	437.301	546.39	0.000
Süre (dk.)/ Time (min.) ( $X_2$ )	1	2.236	2.236	2.98	0.100
Ü/S oranı/ P/S ratio ( $X_3$ )	1	2.236	2.236	2.79	0.110
İkinci dereceden/ Quadratic	3	243.145	81.048	101.27	0.000
$X_1 X_1$	1	238.410	238.410	297.88	0.000
$X_2 X_2$	1	0.227	0.227	0.28	0.600
$X_3 X_3$	1	0.823	0.823	1.03	0.323
İkili interaksiyon/ Binary interaction	3	16.754	5.585	6.98	0.002
$X_1 \times X_2$	1	2.123	2.123	2.65	0.119
$X_1 \times X_3$	1	1.446	1.446	1.81	0.194
$X_2 \times X_3$	1	13.185	13.185	16.47	0.001
Hata/Error	20	16.007	0.800		
/Lack of Fit	3	5.722			
Saf hata/ Pure error	17	10.285			
Toplam/ Total	29	717.828			
$R_2 = \% 97.77$	$R_2$ (adj) = % 96.77	CV = % 0.365			

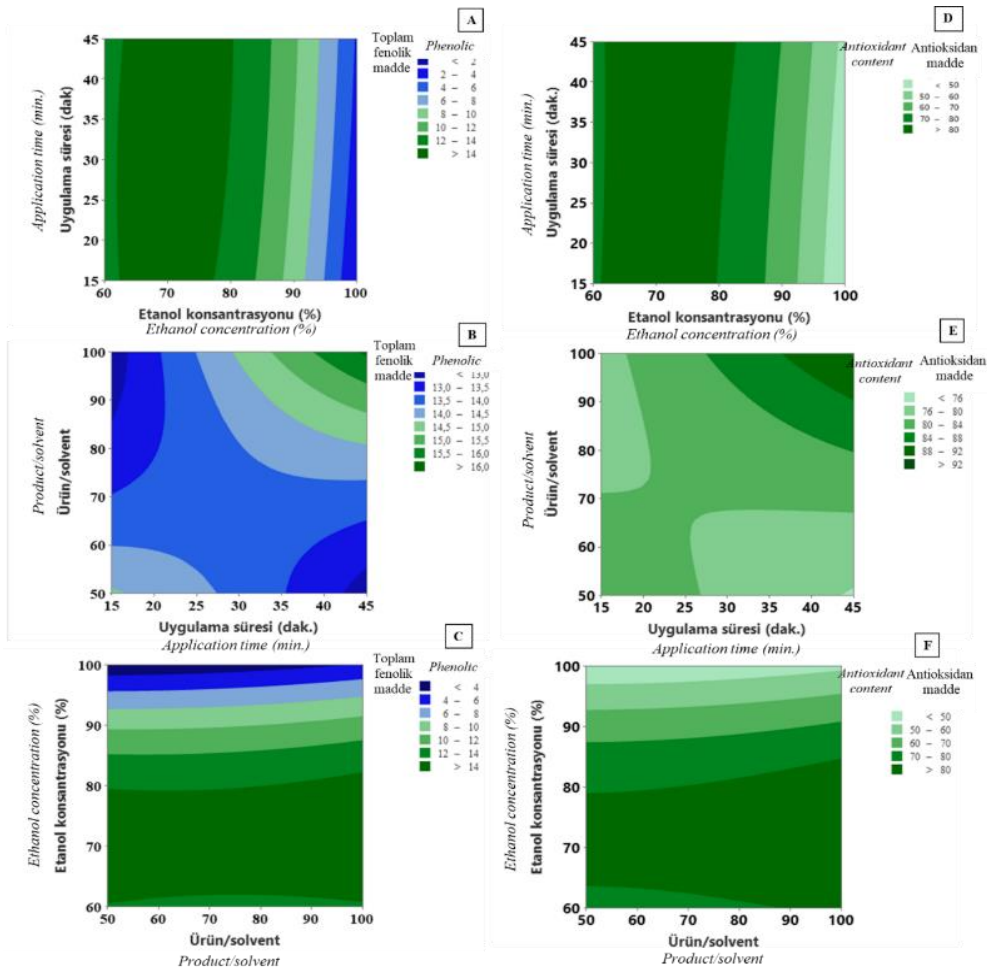
\*Kısaltmalar; TFM; toplam fenolik madde, Ü/S: ürün/solvent  
Abbreviations; TPC; total phenolic content, P/S: product/solvent

Modele ait  $R^2$  değeri % 100'e yaklaştıkça, modelin yanıtları tahmin etmedeki başarısı da artar. Modele eklenen gereksiz terimler modelin  $R^2$  değerinde gereksiz artışa neden olduğu için, bu terimlerin çıkarılması ile elde edilen adj- $R^2$  değerinin de kullanılması önerilmektedir (Montgomery, 2017). TFM için belirlenen  $R^2$  değerinin % 97.77 ve adj- $R^2$  değerinin % 96.77 olarak belirlenmiş olması, modelin TFM verimindeki varyasyonun % 96.77'sini açıklayabildiğini gösterirken, varyasyon katsayısının düşük değeri (CV = % 0.365)

deneysel değerlerin güvenilirliğinin yüksek derecede olduğunu işaret etmektedir (Çizelge 4). CV değerinin % 10'dan düşük olmasının, modelin makul şekilde tekrarlanabilir olduğunu gösterdiği yaygın olarak kabul edilmektedir (Karabegović vd., 2013; Simić vd., 2016). Yani, yeşil sarımsak TFM ekstraksiyon koşullarının bu model ile iyi bir şekilde tanımlanabileceğini söyleyebiliriz. Uyum eksikliği değerleri Çizelge 4'te verildiği gibi istatistiki olarak anlamlı değildir ( $P > 0.05$ ), bu da modelin geçerliliğini doğrulamaktadır.

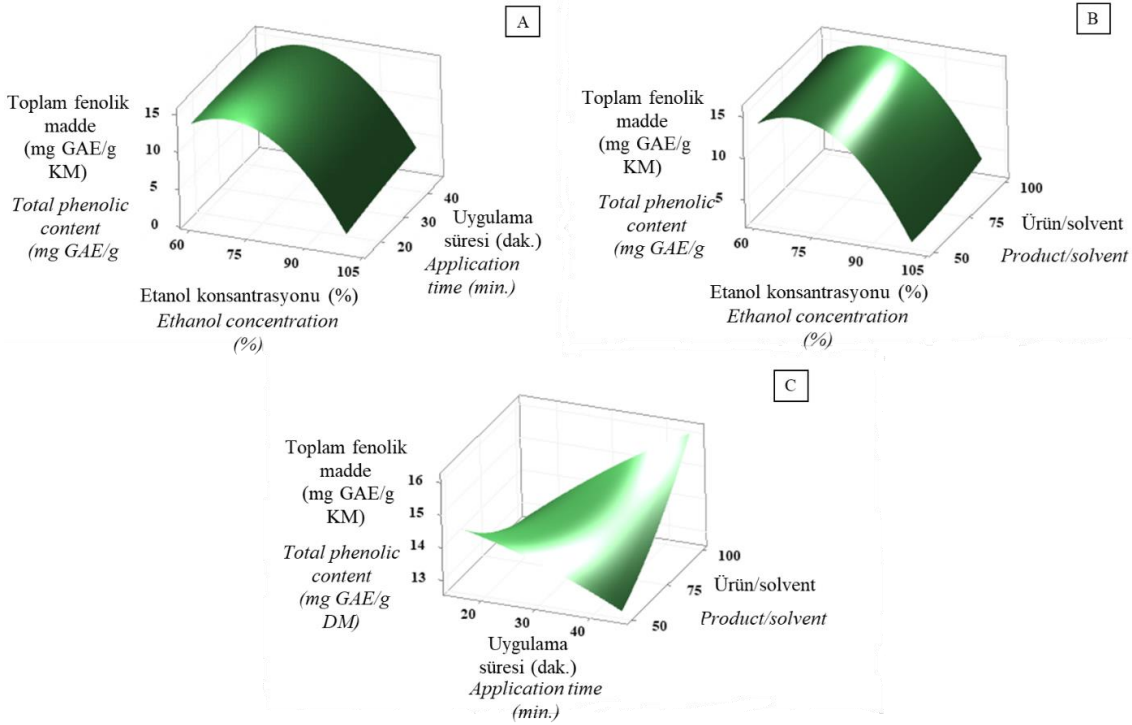
Kontur çizimleri ve 3D yüzey yanıt yöntemi grafikleri ile yanıtlar üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi incelenmiş, Şekil 1 ve Şekil 2'de verilmiştir. Uygulama süresi ve Ü/S oranına bağlı olmaksızın etanol konsantrasyonunun % 60-80 arasında olması örneklerin ekstrakte edilen TFM miktarının en yüksek değerde olmasına ve etanol konsantrasyonunda artış olursa örneklerin ekstrakte edilen TFM değerlerinin düşmesine neden olmaktadır. Uygulama süresi yaklaşık 35 dk. ve üzerine, Ü/S oranı 1/80 ve üzerine çıktığında örneklerin ekstrakte edilen TFM miktarları artmaktadır. Benzer şekilde Alide vd. (2020)

25°C'de yapılan fenolik maddelerin ekstraksiyon işleminde ekstraksiyon süresinin önemsiz olduğunu bildirmiştir. Farklı bitkilerden TFM ekstraksiyonu amacıyla en yüksek verim için gerekli olan etanol konsantrasyon aralığı, yapılan diğer çalışmalardan taze çay yaprakları için % 84.6 (Chebbi vd., 2024), kurkumin için % 40-80 (Jayaprakasha vd., 2002), endemik bir bitki olan *Tabernaemontana beyneana* yaprakları için % 75 (Sathishkumar, et al. 2008) ve yeşil limon kabukları için % 52.9 (Chan vd., 2009) olarak belirlenmiş olan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.



\* Her çizimde eksik olan bağımsız değişkenin değeri merkez noktasında tutulmuştur.  
In each plot, the value of the missing independent variable was kept at the center point.

Şekil 1. Bağımsız değişkenlerin (etanol konsantrasyonu, uygulama süresi ve ürün/solvent oranı) yeşil sarımsak yapraklarından ekstrakte edilen TFM ve AM üzerine etkisinin kontur çizimleri ile gösterimi  
Figure 1. Contour plots of the effects of independent variables (ethanol concentration, application time, and P/S ratio) on TPC and AC extracted from green garlic leaves.



\* Her çizimde eksik olan bağımsız değişkenin değeri merkez noktasında tutulmuştur.  
In each plot, the value of the missing independent variable was kept at the center point.

Şekil 2. Bağımsız değişkenlerin (etanol konsantrasyonu, uygulama süresi ve Ü/S oranı) yeşil sarımsak yapraklarından ekstrakte edilen TFM üzerine etkisinin 3D grafik ile gösterimi

Figure 2. 3D graphic of the effect of independent variables (ethanol concentration, application time, and P/S ratio) on TPC extracted from green garlic leaves.

### Örneklerin Antioksidan Madde Değerleri

Kao vd. (2023) birçok bitkinin TFM ve AM değerleri arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmiştir ( $P < 0.05$ ). Her ne kadar, TFM analizinde kullanılan Folin Ciocalteu yöntemi kısmen antioksidan madde bileşenlerinin miktarı hakkında bilgi verse de, tamamen yeterli olmamaktadır (Lu vd., 2011). Fenolik bileşenlerin yanı sıra proteinler ve peptitler de önemli bir antioksidan aktiviteye de sahip olabilirler (Szychowski vd., 2018). Çalışma kapsamında kullanılan örneklerin AM değerleri % 38.79-89.10 arasında değişmektedir (Çizelge 3). Diğer çalışmalar ile kıyaslandığında; farklı sarımsak çeşitlerinde % 46.3-75.9 AM belirleyen (Szychowski vd., 2018) ve yeşil sarımsak yapraklarında % 63.78 AM (Koca, 2016) belirleyen çalışmalarla benzerlik göstermekte, % 20.05-23.27 arasında AM belirleyen (Fратиanni vd.,

2016) çalışmanın sonuçlarından yüksek bulunmuştur. Farklı örneklere ait farklı AM değerleri genetik kaynak, ekolojik faktörler ve depolama koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir (Akan vd., 2019).

ANOVA sonuçları, modelin istatistiksel anlamlılık sergilediğini göstermektedir ( $P < 0.001$ ) (Çizelge 5). Sonuçlara göre, çok düşük bir  $P$  değeri ( $P < 0.001$ ) ve yüksek  $F$  değeri (60.56) modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.  $P$  ve  $F$  değerlerine göre, AM verimi üzerinde en büyük etkiye sahip olan faktör etanol konsantrasyonu, daha sonra da Ü/S oranıdır. Ayrıca, ikinci dereceden etanol konsantrasyonu\*etanol konsantrasyonu ve ikili interaksiyondan da uygulama süresi ve Ü/S'in ilişkisi de örneklerin AM değerleri üzerine önemlidir ( $P < 0.001$ ).

## Yeşil sarımsak yapraklarındaki fenolik ve antioksidan maddeler

Çizelge 5. Yeşil sarımsak yaprağı örneklerinin AM değerlerine ait ANOVA ve regresyon model özetleri  
Table 5. ANOVA and regression model summaries of AC values of green garlic leaf samples.

Kaynak/ <i>Sources</i>	Serbestlik derecesi / <i>Degree of freedom</i>	Kareler toplamı/ <i>Sum of squares</i>	Kareler ortalaması/ <i>Mean of squares</i>	F değeri/ <i>F value</i>	P değeri/ <i>P value</i>
Model	9	8307.75	923.08	60.56	0.000
Model / <i>Model</i>	3	4990.12	1663.37	109.12	0.000
Doğrusal/ <i>Linear</i>	1	4815.32	4815.32	315.89	0.000
Etanol konsantrasyonu/ <i>Ethanol concentration (X<sub>1</sub>)</i>	1	31.88	31.88	2.09	0.164
Süre (dk.)/ <i>Time (min.) (X<sub>2</sub>)</i>	1	142.92	142.92	9.38	0.006
Ü/S oranı/ <i>P/S ratio (X<sub>3</sub>)</i>	3	3071.23	1023.74	67.16	0.000
İkinci dereceden/ <i>Quadratic</i>	1	2987.30	2987.30	195.97	0.000
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	1	0.55	0.55	0.04	0.851
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	1	14.51	14.51	0.95	0.341
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	3	246.39	82.13	5.39	0.007
İkili interaksiyon/ <i>Binary interaction</i>	1	28.54	28.54	1.87	0.186
X <sub>1</sub> x X <sub>2</sub>	1	0.03	0.03	0.00	0.967
X <sub>1</sub> x X <sub>3</sub>	1	217.83	217.83	14.29	0.001
X <sub>2</sub> x X <sub>3</sub>	20	304.87	15.24		
Hata/ <i>Error</i>	3	103.97	34.66	2.93	0.063
/Lack of Fit	17	200.90	11.82		
Saf hata/ <i>Pure error</i>	29	8612.61			
Toplam/ <i>Total</i>					
	R <sub>2</sub> (adj)= % 94.87	CV= % 1.59			

\*Kısaltmalar; AM; antioksidan madde, Ü/S: ürün/solvent  
*Abbreviations; AC; antioxidant compounds, P/S: product/solvent*

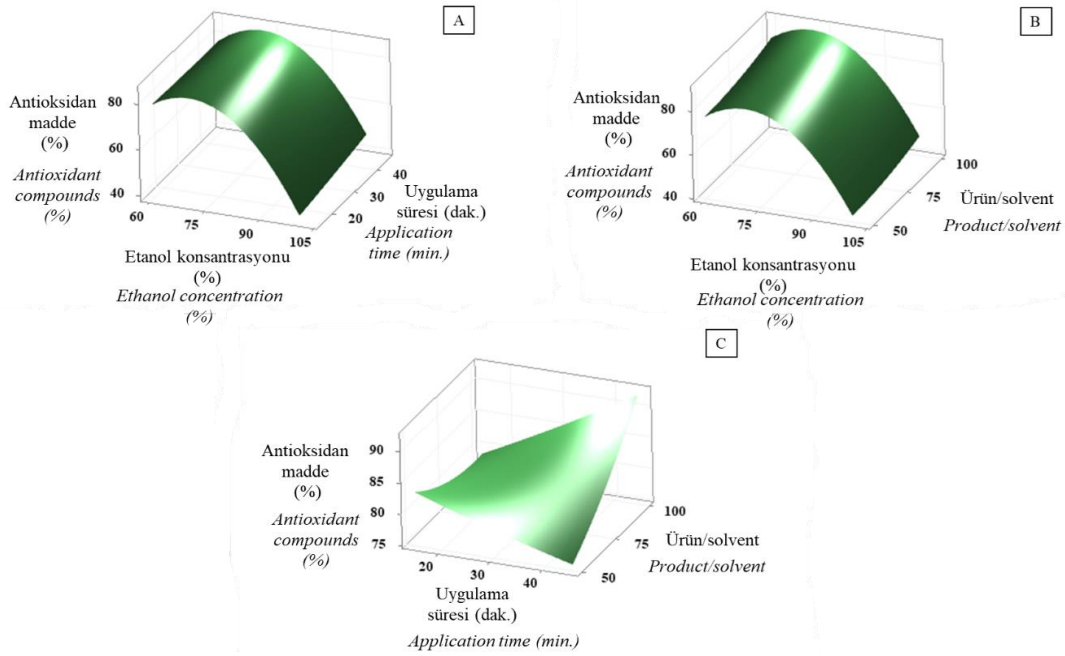
Örneklerin AM için belirlenen R<sup>2</sup> değeri % 96.46 ve adj-R<sup>2</sup> değeri % 94.87'dir (Çizelge 5). Kurulan bu modelin AM verimindeki varyasyonun % 94.87'sini açıklayabildiğini, varyasyon katsayısının düşük değeri (CV = % 1.59) yeşil sarımsak AM ekstraksiyon koşullarının bu model ile iyi bir şekilde tanımlanabileceğini öne sürmektedir. Modele ilişkin uyum eksikliği değeri istatistiki olarak önemsizdir, bu da modelin kullanılabilirliğini kanıtlamaktadır (Çizelge 5).

Örneklere ait AM değerleri üzerine bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiler kontur çizimleri ve 3D yüzey yanıt yöntemi grafikleri ile Şekil 1 ve Şekil 3'te verilmiştir. TFM içeriklerinde elde edilen sonuçlara benzer olarak, örneklere % 60-80 arasında etanol uygulanmasının ekstrakte edilen AM miktarının en yüksek değerde olmasına neden olduğu ve uygulanan etanol konsantrasyonunda artışa bağlı olarak örneklerin ekstrakte edilen AM

değerlerinin düştüğü belirlenmiştir. Benzer eğilim, farklı etanol konsantrasyonlarının farklı bitki materyallerin AM değeri üzeri etkisini inceleyen çalışmalarda da belirlenmiştir (Lee vd., 2016; Zhou vd., 2019; Chebbi vd., 2024). Ayrıca, elde edilen sonuçlar farklı bitki ekstraktlarında yapılan çalışmalarda en iyi ekstraksiyonun sağlandığı etanol konsantrasyonlarını, yasemin çiçeğinde (Sathishkumar vd., 2013) ve kahverengi soya fasulyesinde (Lee vd., 2016) % 75, kırmızı kılıç fasulyesinin tohum kabuğunda % 60 (Zhou vd., 2019) belirleyen çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Çözücünün ve farklı antioksidan bileşiklerin polaritesi, ekstraksiyonun verimliliğini ve elde edilen ekstraktların aktivitesini etkilemektedir (González-Montelongo vd., 2010). Farklı etanol konsantrasyonlarının çözücünün fiziksel özelliklerini etkilediği, bu nedenle biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon veriminin çözücü konsantrasyonuna bağlı olduğu

bildirilmiştir (Lee vd., 2016). Su, güçlü bir polar çözücü iken, etanol daha düşük polariteye sahiptir, ancak her ikisi de herhangi bir oranda karışabildiği için herhangi bir tek çözücü sisteminden daha etkili fenolik bileşikler çıkarma kombinasyonları oluşturulabileceği belirtilmektedir (Arruda vd., 2017). Ayrıca, polar olmayan kovalent moleküller, su molekülleri

arasındaki etkileşimi bozmak için gereken enerji nedeniyle düşük konsantrasyonlu etanol çözücüsünde daha az çözünebilir (Lee vd., 2016). Uygulama süresi yaklaşık 30 dk. ve üzerine, Ü/S oranının % 80 ve üzerine çıktığında örneklerin ekstrakte edilen AM miktarları en yüksek seviyelerde tespit edilmektedir.



\* Her çizimde eksik olan bağımsız değişkenin değeri merkez noktasında tutulmuştur.  
In each plot, the value of the missing independent variable was kept at the center point.

Şekil 3 Bağımsız değişkenlerin (etanol konsantrasyonu, uygulama süresi ve Ü/S oranı) yeşil sarımsak yapraklarından ekstrakte edilen AM üzerine etkisinin 3D grafik ile gösterimi

Figure 3. 3D graphic of the effect of independent variables (ethanol concentration, application time, and P/S ratio) on AC extracted from green garlic leaves.

Yeşil sarımsak TFM ve AM verimi ile ekstraksiyon koşulları arasındaki ampirik ilişki kodlanmış değerler cinsinden ikinci dereceden polinom modelleri ile oluşturulmuş ve aşağıda verilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{TFM} = & 13.890 - 5.228 X_1 + 0.386 X_2 + 0.374 X_3 \\ & - 5.682 X_1 * X_1 - 0.175 X_2 * X_2 + 0.334 X_3 * X_3 \\ & + 0.515 X_1 * X_2 + 0.425 X_1 * X_3 + 1.284 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \% \text{ AM} = & 80.76 - 17.348 X_1 + 1.412 X_2 + 2.989 X_3 \\ & - 20.11 X_1 * X_1 + 0.27 X_2 * X_2 + 1.40 X_3 * X_3 \\ & + 1.89 X_1 * X_2 + 0.06 X_1 * X_3 + 5.22 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (4)$$

### Optimizasyon ve Validasyon

YYY ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre yeşil sarımsakta hem TFM ve hem AM değerleri en yüksek tespit edilen optimum ekstraksiyon koşulları; % 69.70 etanol, 15 dk. uygulama süresi ve Ü/S oranı 1/50 olarak belirlenmiştir. Bu optimize edilmiş parametrelere dayanarak, TFM değeri 16.242 mg GAE/g KM, AM % 87.86 olarak tahmin edilmiştir. YYY'nin bu modeli tanımlamak için geçerliliğini değerlendirmek amacıyla, optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonunda ekstraktın TFM ve AM değerleri tekrar belirlenmiştir. Validasyon

amacıyla yapılan çalışma sonucunda örneklerin TFM ve AM değerleri sırasıyla tahmin edilen aralıkta olan  $15.18 \pm 1.4$  ve  $\% 88.16 \pm 1.18$  mg GAE/g KM olarak belirlenmiştir. Model ile tahmin edilen değerler ve deneysel değerler t testi ile karşılaştırıldığında önemli farklılık bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ). Böylece modelin güvenilir ve yeşil sarımsak TFM ve AM ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi için kullanılabilir olduğu kanıtlanmıştır.

## SONUÇ

Sahip olduğu biyoaktif maddeler nedeniyle sağlık üzerine birçok olumlu özelliği olan sarımsak birçok hastalığın tedavisinde de önerilmektedir.

Bu çalışmada, yeşil sarımsağın TFM ve AM ekstraksiyon koşulları araştırılmış ve optimize edilmiştir. YYY'den elde edilen sonuçlar, ekstraksiyon işlemi üzerine esas olarak etanol konsantrasyonunun etkili olduğunu göstermiştir.  $\% 60-80$  aralığında uygulanan etanolün örneklerin TFM ve AM ekstraksiyonunu artırdığı, daha yüksek konsantrasyonda etanolün verimi düşürdüğü belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon sonucunda; optimum koşullar  $\% 69.70$  etanol, 15 dk. uygulama süresi ve Ü/S oranı 1/50 olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında, ekstraktın TFM ve AM değerleri sırasıyla  $15.18 \pm 1.4$  mg GAE/g KM ve  $\% 88.16 \pm 1.18$  olarak belirlenmiştir.

Bu çalışma sonuçlarının, yeşil sarımsak veya diğer bitki kaynaklı fenolik ve antioksidan maddelerin en yüksek verimde ekstra edilmesi üzerine yapılan optimizasyon çalışmalarına yol göstermesi ve bitkisel ekstraktların farklı gıdalarda veya ilaçlarda uygulanmasının araştırılmasına öncü olması beklenilmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarın hiçbir kişi ve/veya kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## KAYNAKLAR

Akan, S., Horzum, O., Tuna Güneş, N. (2019). "The effect of modified atmosphere packaging on keeping quality in green garlic (*Allium sativum* L.) leaves." *Mustafa Kemal University Journal of*

*Agricultural Sciences/Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi* 24.3.

Alide, T., Wangila, P., Kipro, A. (2020). Effect of cooking temperature and time on total phenolic content, total flavonoid content and total in vitro antioxidant activity of garlic. *BMC Research Notes*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05404-8>

Anonymous (2024) TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-1.Tahmini-2024-53449>. (Erişim tarihi: 01.08.2024)

Arruda, H. S., Pereira, G. A., Pastore, G. M. (2017). Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolics from *Annona crassiflora* Mart. (*Araticum*) Fruits Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, 10(1), 100–110. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0554-y>

Ayaz, E., Can, H. (2007). Sarımsak (*Allium sativum*) ve Geleneksel Tedavide Kullanımı. *Türkiye Parazitol Derg*, 31(2), 145–149.

Bonaccorsi, P., Caristi, C., Gargiulli, C., Leuzzi, U. (2008). Flavonol glucosides in *Allium* species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chemistry*, 107(4), 1668–1673. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.053>

Cemeroğlu, B. (2010). General methods in food analysis. *Food analysis*. Food Technology Association.

Chan, S. W., Lee, C. Y., Yap, C. F., Wan Aida, W. M., Ho, C. W. (2009). Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal*, 16(2), 203–213.

Chebbi, H., Turkmen Erol, N., Incedayi, B., Sari, F. (2024). Bioactive compounds of fresh tea shoots plucked in different seasons: optimization of extraction of polyphenols. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 4192–4203. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02486-x>

Durukan, G., Sari, F., Karaoglan, H. A. (2023). Microbial Evaluation of Fermented Beetroot Juice Produced by Probiotic *Lactocaseibacillus paracasei*. 4(1), 1–9. *Journal of Raw*

- Materials to Processed Foods, 4(1), 1-9.
- Durukan, G., Sari, F., Karaoğlan, H. A. (2024). A beetroot-based beverage produced by adding *Lactocaseibacillus paracasei*: an optimization study. *Quality Assurance of Crop and Foods*, 16(3), 10–24. <https://doi.org/10.15586/qas.v16i3.1499>
- Erol, N. T., Incedayi, B., Sari, F., Copur, O. U. (2022). Valorization of agricultural by-product: Optimization of alcohol-based extraction of polyphenols from chestnut peel using Box-Behnken Design. *International Food Research Journal*, 29(1), 86–97. <https://doi.org/10.47836/ifrj.29.1.10>
- Fратиани, F., Ombra, M. N., Cozzolino, A., Riccardi, R., Spigno, P., Tremonte, P., Coppola, R., Nazzaro, F. (2016). Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Functional Foods*, 21, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.019>
- González-Montelongo, R., Gloria Lobo, M., González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030–1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.012>
- Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S., Negi, P.S., Sakariah, K.K. (2002) Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: a byproduct from curcumin production. *Z Naturforsch*, 57c:828–835
- Kao, C.-C., Wang, H.-M., Tsai, S.-J., Lin, J.-Y. (2023). Sensory and microbial analyses on naturally lacto-fermented cucumbers. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 32(February), 100714. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100714>
- Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N. Č., Lazić, M. L. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction and characterization of phenolic compounds in cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves. *Separation and Purification Technology*, 120, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.10.021>
- Karaoğlan, H. A., Aktas, A. B. (2023). Optimization of Spontaneous Fermentation Conditions of Kohlrabi by Response Surface Methodology. *Fermentation*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060550>
- Koca, I., Tekgöler, B., Koca, A.F. (2016) Antioxidant properties of green Allium vegetables. ISHS. VII Int. Sym. on Edible Alliaceae, October 28, Niğde, Turkey. pp 201-206.
- Kumar, S. N. A., Ritesh, S. K., Sharmila, G., Muthukumaran, C. (2017). Extraction optimization and characterization of water soluble red purple pigment from floral bracts of Bougainvillea glabra. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2145–S2150. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.047>
- Lee, C. H., Hwang, K. E., Kim, H. W., Song, D. H., Kim, Y. J., Ham, Y. K., Choi, Y. S., Jang, S. J., Jeong, T. J., Kim, C. J. (2016). Antioxidant activity of brown soybean ethanolic extracts and application to cooked pork patties. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(3), 359–368. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.3.359>
- Lu, X., Ross, C. F., Powers, J. R., Aston, D. E., Rasco, B. A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of garlic (*Allium sativum*) and elephant garlic (*Allium ampeloprasum*) by attenuated total reflectance-fourier transformed infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5215–5221. <https://doi.org/10.1021/jf201254f>
- Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. John Wiley & sons.
- Sathishkumar, T., Baskar, R., Aravind, M., Tilak, S., Deepthi, S., Bharathikumar, V. M. (2013). Simultaneous Extraction Optimization and Analysis of Flavonoids from the Flowers of Tabernaemontana heyneana by High Performance Liquid Chromatography Coupled to Diode Array Detector and Electron Spray Ionization/Mass Spectrometry. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2013/450948>

- Simić, V. M., Rajković, K. M., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N., Lazić, M. L., Karabegović, I. T. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology*, 160, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.019>
- Singh, B., Sharma, H. K., Sarkar, B. C. (2012). Optimization of extraction of antioxidants from wheat bran (*Triticum* spp.) using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 49(3), 294–308. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0276-5>
- Strati, I. F., Kostomitsopoulos, G., Lytras, F., Zoumpoulakis, P., Proestos, C., Sinanoglou, V. J. (2018). Optimization of polyphenol extraction from allium ampeloprasum var. porrum through response surface methodology. *Foods*, 7(10). <https://doi.org/10.3390/foods7100162>
- Szychowski, K. A., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Gawel-Bęben, K., Aświeca, M., Kara, M., Jakubczyk, A., Matysiak, M., Binduga, U. E., Gmiński, J. (2018). Characterization of Active Compounds of Different Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(1), 73–81. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2017-0005>
- Sathishkumar, T., Baskar, R., Shanmugam, S. (2008). Optimization of flavonoids extraction from the leaves of *Tabernaemontana beyneana* wall using L16 orthogonal design. *Nature and Science*. 2008;6(3):10-21.
- Tsao, R., Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812(1-2 SPEC. ISS.), 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.028>
- Zhou, Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Zheng, J., Li, Y., Zhang, J. J., Xu, D. P., Li, H. Bin. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from the seed coats of red sword bean (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.). *Antioxidants*, 8(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox8070200>





## DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERİN PORTAKAL KABUĞUNDAN BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYONUNA ETKİSİ

Naciye KUTLU\*, Hanife HACİBEKTAŞOĞLU

Bayburt Üniversitesi, Aydıntepe Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Aydıntepe, Bayburt, Türkiye

Geliş/Received: 30.07.2024; Kabul /Accepted: 24.09.2024; Online baskı /Published online: 28.09.2024

Kutlu, N., Hacibektaşoğlu, H. (2024). Derin ötektik çözücülerin portakal kabuğundan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonuna etkisi. GIDA (2024) 49 (5) 934-945 doi: 10.15237/gida.GD24078

*Kutlu, N., Hacibektaşoğlu, H. (2024). Effect of deep eutectic solvents on extraction of bioactive compounds from orange peel. GIDA (2024) 49 (5) 934-945 doi: 10.15237/gida.GD24078*

### ÖZ

Atık değerlendirme kapsamında en önemli meyve atıklarından biri olan portakal kabuğuna alternatif kullanım alanı oluşturmak adına bu çalışma planlanmıştır. Çalışmada, öncelikle organik çözücülerin (etanol, metanol ve su) yerine alternatif olabilecek farklı tipte derin ötektik çözücüler kullanılarak ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi eşliğinde portakal kabuğu ekstraktları hazırlanmış olup bu ekstraktların biyoaktif bileşik içerikleri (toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite ve bireysel fenolik bileşik profili) değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, derin ötektik çözücülerin en yüksek toplam flavonoid madde ve antioksidan aktivite değerlerinin sağlanmasında istatistiksel olarak etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bireysel fenolik bileşik profili incelendiğinde en baskın bileşenin hesperidin olduğu görülmüş ve en yüksek değere kolin klorür:gliserol (1:2) kombinasyonu ile ulaşılmıştır. Sonuçta derin ötektik çözücülerin portakal kabuğundan fitokimyasal bileşiklerin ekstraksiyonunda organik çözücülere alternatif olabildikleri saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Portakal kabuğu, ultrasonik ekstraksiyon, yeşil çözücü, fenolik profil

## EFFECT OF DEEP EUTECTIC SOLVENTS ON EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ORANGE PEEL

### ABSTRACT

This study was planned to create an alternative use for orange peel, which is one of the most important fruit wastes within the scope of waste utilization. In the study, firstly, orange peel extracts were prepared by ultrasonic assisted extraction using different types of deep eutectic solvents in the green solvent category that can be alternative to organic solvents and the bioactive compound contents of these extracts were evaluated. As a result, it was determined that deep eutectic solvents were statistically effective in providing the highest total flavonoid compound and antioxidant activity values. In addition, when the individual phenolic compound profile was examined, the most dominant component was hesperidin and the highest value was reached with choline chloride:glycerol (1:2) combination. In conclusion, it was determined that deep eutectic solvents can be an alternative to organic solvents in the extraction of phytochemical compounds from orange peel.

**Keywords:** Orange peel, ultrasonic extraction, green solvent, phenolic profile

\* Yazışmalardan sorumlu yazar/ Corresponding author:

✉: naciye.kutlu@bayburt.edu.tr

☎: (+90) 458 311 4426

☎: (+90) 458 311 4466

Naciye Kutlu; ORCID no: 0000-0002-4075-8823

Hanife Hacibektaşoğlu; ORCID no: 0009-0004-2000-5578

## GİRİŞ

Gıda endüstrilerinin karşılaştığı en büyük sorunlardan biri, işleme sonrasında açığa çıkan büyük miktarda atık oluşumudur. Bu durum dünyada küresel açıdan önem arz etmekte olup, kaynakların boşuna tüketimi anlamına gelmektedir (Caldeira vd., 2019). Dünyada üretilen gıdanın neredeyse 1/3'ü besin zinciri boyunca israf edilmektedir (Corrado vd., 2019). Bu nedenle gıda atıklarının (yan ürünlerinin) değerlendirilmesi, ilgili sorunları en aza indirmek adına birçok araştırmacının odak noktası olmuştur. Hatta gıda israfı konusunda farkındalık yaratmak dünya çapında siyasi bir öncelik haline gelmiştir (Kringel vd., 2019). Evlerde meydana gelen atıkların, Avrupa'da toplam gıda atıkların %50'sinden fazlasını, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise toplam gıda atıklarının %60'ını oluşturduğu tahmin edilmektedir (Stancu vd., 2016). Ayrıca evlerdeki atıkların da %50'sinin meyve ve sebzelerden kaynaklandığı bilinmektedir. Oluşan bu atıklar hem gıda ve tarım sektöründe zararlara yol açmakta hem de ciddi derecede çevreye zarar vermektedir. Bu yüzden, atıkların değerlendirilerek katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi gerekmektedir (Kringel vd., 2019).

Dünyada turunçgil üretim alanlarının %45'ini portakal, %35'ini mandalina, %15'ini limon ve %4'ünü greyfurt oluşturmaktadır. USDA (United States Department of Agriculture- Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı) verilerine göre, 2021/22 piyasa yılı itibarıyla dünyada toplam 49 milyon ton portakal üretilmektedir ve portakalın bu denli ciddi bir paya sahip olmasının en önemli sebebi özellikle meyve suyu sanayisi tarafından en çok tercih edilen turunçgil türü olmasıdır (Anonim, 2023). Türkiye ise 1,8 milyon tonluk üretim miktarı ile dünya portakal üretiminde 7. sırada bulunmaktadır (TÜİK, 2023). Son zamanlarda, bazı çalışmalar, portakal gibi meyvelerin yan ürünlerinin, doğal bir antioksidan kaynağı olabileceğini rapor etmişlerdir (Lagha-Benamrouche ve Madani, 2013; Temirbekova, 2019). Portakalın meyve suyuna işlenmesi sırasında yaklaşık %50 oranında atık oluşmaktadır ve bu atığın büyük çoğunluğunu kabuk kısmı oluşturur (Hashmi vd., 2012; Kaynarca ve Aşkın,

2020). Portakal kabuğunun antioksidan, antimikrobiyal, antikarsinogenik ve antienflamatuar özelliğinin olduğu ve yüksek fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Ghasemia vd., 2009; Khan vd., 2010; Güzel ve Akpınar, 2017).

Ultrasonik destekli ekstraksiyon yeşil teknolojiler arasında yer almaktadır. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda, materyal ile ses dalgaları etkileşime girmekte ve hücrelerde bazı değişimler meydana gelmektedir. Bu yöntemde ana itici güç akustik kavitasyon olarak tanımlanır. Bu etki ile ortamdaki moleküller bir dizi sıkışma ve gevşeme döngüsüne girmektedir. Bu şekilde değişen basınç, sıvı ortamdaki kabarcık oluşumuna ve etki sonunda bu kabarcıkların patlamasını sağlamaktadır (Piyasena vd., 2003). Ultrases teknolojisi ile oluşan mekanik etkiler kütle transferi olumlu yönde etkilenmektedir (Awad vd., 2012). Ek olarak, uygulama sırasında geleneksel yöntemlere kıyasla düşük çalışma sıcaklıkları ile biyoaktif bileşiklerinden sıcaklığa duyarlı/kararsız bileşenlerin de ekstraksiyonunu gerçekleştirerek daha yüksek başarıya ulaşmayı mümkün kılmaktadır (Madhu vd., 2019). Ayrıca, bu yöntemin en önemli avantajı işlem süresini kısaltmasıdır. Bunun yanı sıra, geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, çözücü tüketimi ve enerji sarfıyatı azalmakta, son ürün kalitesi ve işlem verimi daha yüksek olmaktadır (Chemat vd., 2017).

Bununla birlikte, ekstraksiyonda kullanılan çözücünün türü, termal kararsızlığı, çözünürlüğü, polaritesi, toksisitesi ve konsantrasyonu gibi birçok faktör genel olarak ilgili üründen doğal biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon başarısı için oldukça önemlidir (Mbous vd., 2017). Metanol, asetonitril, etanol, hekzan ve aseton gibi geleneksel organik çözücüler, ekstraksiyon, ayırma ve ön konsantrasyon dahil olmak üzere gıda analizi için saflaştırma teknolojilerinde gereklidir. Bu geleneksel organik çözücüler düşük maliyetlidir ancak bunların kalıntı seviyeleri ve bunun sonucunda ortaya çıkan kirlilik endişe vericidir (Chen vd., 2019). Bu nedenle son yıllarda gıda ürünlerinden doğal biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için çözücü arayışı derin ötektik

çözücülerin de dahil olduğu bazı yeşil çözücü tiplerinin keşfine yol açmıştır (Mbous vd., 2017).

Derin ötektik çözücüler, en az bir hidrojen bağı alıcı (HBA) ve bir hidrojen bağı donörün (HBD) karışımlarıdır. Bu formülasyonda iki ya da daha fazla bileşiğin karışmasıyla, bu karışımı oluşturan bileşiklerin erime noktalarından daha düşük değere sahip olan bir karışım oluşabilmektedir (Kutlu vd., 2021). Derin ötektik çözücüler geleneksel iyonik sıvılardan farklı kimyasal özelliğe sahip olmalarına rağmen benzer fiziksel özelliğe sahiptirler. Bununla birlikte derin ötektik çözücüler düşük buhar basıncı, yanmazlık, kolay hazırlama, toksik olmama, ham maddenin ucuz olması gibi belirli avantajlara sahiptir (Smith vd., 2014). En yaygın derin ötektik çözücüler hidrojen bağı alıcı olarak kolin klorür (ChCl)'ün, hidrojen bağı donörü olarak ise üre, sitrik asit, süksinik asit ya da gliserol vb. bileşiklerin kullanıldığı kombinasyonlardır (Paiva vd., 2014). Bu gibi doğal ürünler (birincil metabolitlere dayanan), muazzam kimyasal çeşitlilikleri, biyolojik olarak bozunabilir özellikleri ve farmasötik olarak kabul edilebilir toksisite profiline sahip olmaları nedeni ile ideal çözücü olarak değerlendirilmektedir (Dai vd., 2013a). Derin ötektik çözücüler sınıfında sınıflandırılan çözücüler farklı uygulama alanlarında eşsiz sonuçlar ortaya çıkarmasına rağmen biyolojik ve endüstriyel uygulamaları ile alakalı yeterli bilimsel verinin olmaması nedeniyle bu çözücülerin özellikle ticari formülasyonlarda kullanımına dikkate edilmesi gerektiği rapor edilmektedir. (Hayyan vd., 2013). Bu nedenle son birkaç yıldır gıda ve farklı uygulama alanlarında sıklıkla tercih edilmeye başlanan bu çözücüler kullanılarak yapılacak olan çalışmaların sonuçları sürdürülebilirlik açısından önem arz etmektedir.

Yapılan literatür taramasında portakal kabuğundan biyoaktif bileşik eldesinde çözücü olarak derin ötektik çözücünün kullanıldığı sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Ozturk vd. (2018) kolin klorür bazlı gliserol ve etilen glikol kombinasyonlarında hazırladıkları derin ötektik çözücüler ile portakal kabuğundan geleneksel ekstraksiyon yöntemi kullanarak işlem uygulamışlardır. Bizim çalışmamızda daha fazla sayıda ve farklı derin ötektik çözücü

kombinasyonları kullanılmış olması ve ultrasonik destekli ekstraksiyon kullanımını bu çalışmadan farkımızı göstermektedir. Ek olarak geleneksel ekstraksiyon yöntemleri yerine ultrasonik destekli ekstraksiyon kullanmak çalışmamızın diğer bir önemli özelliğidir. Gómez-Urios vd. (2022) ve Viñas-Ospino vd. (2023) yaptıkları çalışmalarda, portakal kabuğunun ekstraksiyonunda farklı derin ötektik çözücülerin karotenoidler üzerine etkilerini incelemişler, fakat bizim çalışmamızda kullanılan derin ötektik çözücü kombinasyonlarını değerlendirmemişlerdir. Lin (2022) portakal kabuğundan fenolik asit ekstraksiyonunda sadece kolin klorür:glukoz (farklı molar oranlarında) kombinasyonunu kullanmıştır. Bu çalışmada kullanılan çözücü ile de bizim çalışmamızda kullanılan çözücüler farklıdır. Zhou vd. (2023) ise portakal kabuğundan fitokimyasal bileşik ekstraksiyonunda sadece kolin klorür:laktik asit (molar oran 1:2) kombinasyonunu kullanmıştır. Farklı materyallerle yapılan çalışmalar incelendiğinde, Dai vd., (2013b) *Carthamus tinctorius* L. bitkisinden derin ötektik çözücüler ile hem polar hem de daha az polar metabolitlerin ekstrakte edilebilirliğinin geleneksel çözücülerden daha fazla olduğunu göstermiştir ve derin ötektik çözücülerin çok çeşitli metabolitler için mükemmel çözücüler olduğunu kanıtlamıştır (Dai vd., 2013a). Benzer şekilde yapılan araştırmalarda farklı derin ötektik çözücü uygulamalarının gıda materyallerinden biyoaktif bileşik ekstraksiyonunda kullanımının kozmetik ve gıda endüstrilerinde kullanım potansiyeli için umut verici olduğu rapor edilmiştir (Dai vd., 2013b). Bu nedenle bu çalışma, portakal kabuğundan farklı derin ötektik çözücülerin (Kolin klorür:gliserol – molar oran 1:2, Kolin klorür:laktik asit – molar oran 1:2, Kolin klorür:asetik asit – molar oran 1:2 ve Kolin klorür:üre – molar oran 1:2) birlikte kullanılması ile biyoaktif içeriklerinin belirlenmesi konusunda özgün çalışma niteliğindedir.

Bu çalışmada, öncelikle organik çözücülerin (etanol, metanol ve su) yerine alternatif olabilecek farklı tipte derin ötektik çözücüler çözücülerin (Kolin klorür:gliserol – molar oran 1:2, Kolin klorür:laktik asit – molar oran 1:2, Kolin klorür:asetik asit – molar oran 1:2 ve Kolin klorür:üre – molar oran 1:2) kullanılarak

ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi eşliğinde portakal kabuğu ekstraktları hazırlanmış olup bu ekstraktların biyoaktif bileşik içerikleri (toplam fenolik bileşik, toplam flavonoid bileşik, antioksidan aktivite ve bireysel fenolik bileşik profili) değerlendirilerek en yüksek verime sahip derin ötektik çözücü kombinasyonu belirlenmiştir. Gıda üretiminin her aşamasında gıda kalite/güvenilirlik analizlerinin zorunlu hal aldığı günümüzde hem insan sağlığı ve hem de çevre sağlığını korumak adına, biyoaktif maddelerin eldesinde organik çözücülere alternatif olarak yeşil bir alternatif çözücü oluşturma öngörüsü ile çalışma yürütülmüştür.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Portakal (*Citrus sinensis*) kabuğu, Bayburt'ta bulunan yerel meyve suyu üreticilerinden temin edilmiştir. Portakal kabuğu öncelikle 60 °C sıcaklıkta sıcak hava ile kurutularak toz haline getirilmiş (Fakir, Aromatic, Almanya) ve ekstraksiyon işlemlerinde kullanılmaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Analizlerde ve derin ötektik çözücü hazırlanmasında kullanılan kimyasallar, analitik saflıktadır.

### Yöntem

#### Derin ötektik çözücülerin (DES) hazırlanması

Çalışmada hidrojen bağ alıcısı (HBA) olarak kuarterner amonyum tuzu olan kolin klorür kullanılmıştır. Hidrojen bağ donörü (HBD) olarak ise 4 farklı bileşen belirlenmiştir. Ekstraksiyon deneylerinde kullanılan kolin klorür bazlı DES kombinasyonları, su ve molar oranları Çizelge 1'de sunulmuştur. Derin ötektik çözücüler oluşturulduktan sonra, yüksek viskozite

olumsuzluğunu bertaraf etmek adına %30 oranında (Zhang ve Wang, 2017) su ilave edilmiştir. Karışım daha sonra homojen renksiz bir sıvı elde edilene kadar çalkalamalı inkübatör kullanılarak 30 °C ve 180 devir/dk'da karıştırılmıştır. Ardından, reaksiyona girmemiş serbest asitleri uzaklaştırmak amacıyla, 80 °C'de 12 saat kadar bekletilmiştir (Xu vd., 2016). Ek olarak geleneksel çözücülerden ekstraksiyon proseslerinde en çok tercih edilenler (etanol, metanol ve saf su) de çalışma kapsamında kullanılmıştır. Ekstraksiyon veriminde derin ötektik çözücüler ile karşılaştırılan grup, çözücü olarak etanol kullanılan gruptur. Bunun nedeni ise, organik çözücülerden olan etanolün literatürde fenolik bileşik ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılan çözücülerden biri olmasıdır (Plaskova ve Mlcek, 2023).

#### Ultrasonik destekli ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon öncesinde, kurutulmuş ve toz haline getirilmiş olan portakal kabuğu ve Çizelge 1'de verilen çözücüler katı:çözücü oranı 1/30 g/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Ardından ultrasonik banyoda (Kudos, SK2210HP, Hindistan) 150 W ultrasonik güçte, 40 °C sıcaklıkta, 45 dk bekletildikten sonra buradan alınan çözeltiler daha sonra 3500 devir/dk'da 40 dk boyunca santrifüj (Hermle Z 326K, Hermle Labortechnik, Wehngen, Almanya) edilmiştir. Ekstraksiyon koşulları literatür baz alınarak belirlenmiştir (İnce vd., 2014; Çelik vd., 2022). Santrifüj sonunda çözeltilerin süpernatant kısmı alınarak 0.45 µm çapında filtreden filtre edilerek analizlerde kullanılmaya kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan derin ötektik ve geleneksel çözücüler

Table 1. Deep eutectic and conventional solvents used in the study

No	Bileşen 1 (HBA) Component 1 (HBA)	Bileşen 2 (HBD) Component 2 (HBD)	Su oranı (%) Water ratio (%)	Molar oran Molar ratio
1	Kolin Klorür	Gliserol	30	1:2
2	Kolin Klorür	Laktik asit	30	1:2
3	Kolin Klorür	Asetik asit	30	1:2
4	Kolin Klorür	Üre	30	1:2
5		Metanol	70	-
6		Etanol	70	-
7		Saf su (Distilled water)	100	-

#### *Toplam fenolik madde (TFM)*

Çalışmada hazırlanan portakal kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik bileşik tayini Folin-Ciocalteu metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Slinkard ve Singleton, 1977). Fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu ayracını indirgediği bir redoks reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Bu amaçla rnekler Folin-Ciocalteu ayracı ve sodyum karbonat (NaCO<sub>3</sub>) ile muamele edilerek, 765 nm dalga boyunda absorbans değeri llmştir. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmış ve sonuçlar mg GAE/100 g kuru madde şeklinde ifade edilmiştir.

#### *Toplam flavonoit madde (TFlaM)*

Portakal kabuğu ekstraktlarının toplam flavonoit madde analizi, Zhishen vd. (1999) tarafından uygulanan yöntemin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Buna göre 1 mL ekstrakt, 0.3 mL NaNO<sub>2</sub> (%5) zltisi ilave edildikten sonra 0.3 mL AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (%10) zltisi ile karıştırıldı. 2 mL 1 M NaOH zltisi, ardından 2.4 mL su ilave edildi ve karışım karıştırıldı. Karışımın absorbansı, bir Epoch2 mikropilaka okuyucusu (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, ABD) tarafından 510 nm'de llmştir. Oluşturulan kuersetin standart eğrisinde örneklerin gösterdiği absorbans değerine karşılık gelen toplam flavonoit madde miktarı kuersetin eşdeğeri (KE) olarak hesaplanmış ve sonuçlar mg KE/100 g kuru madde şeklinde ifade edilmiştir.

#### *Antioksidan aktivite*

Portakal kabuklarının farklı zcler ile hazırlanan ekstraktlarında antioksidan aktivite testleri 3 farklı yöntem (CUPRAC, CERAC ve DPPH•) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi: Portakal kabuğu ekstraktlarının CUPRAC yöntemi kullanılarak antioksidan kapasite lmleri Apak vd. (2004) nerdiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Toplam antioksidan kapasite hesaplanırken troloks referans olarak kullanılmış ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri (TE)/100 g kuru madde şeklinde ifade edilmiştir.

Seryum (IV) indirgeyici antioksidan kapasite (CERAC) yöntemi: Portakal kabuğu ekstraktlarının CERAC yöntemi kullanılarak antioksidan kapasite ölçümleri zyurt vd. (2007) tarafından önerilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Toplam antioksidan kapasite hesaplanırken troloks referans olarak kullanılmış ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri (TE)/100 g kuru madde şeklinde ifade edilmiştir.

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal söndürücü kapasite yöntemi: Portakal kabuğu ekstraktlarının DPPH• yöntemi kullanılarak antioksidan kapasite lmleri Szabo vd. (2007) nerdiği yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Toplam antioksidan kapasite hesaplanırken troloks referans olarak kullanılmış ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri (TE)/100 g kuru madde şeklinde ifade edilmiştir.

#### *Bireysel fenolik bileşik profili*

Portakal kabuğu ekstraktlarının bireysel fenolik bileşik profili LC-MS/MS kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ecem Bayram vd., 2020; Ecem Bayram vd., 2021). Toplam 28 farklı fenolik bileşiğin taraması portakal kabuğu ekstraktlarında gerçekleştirilmiştir. Hidroliz yöntemiyle ekstraksiyon, 100 µl numunenin 200 µl 2 mol-l-1 HCl ile karıştırılmasını ve 30 saniye boyunca vortekle karıştırılmasını içermektedir. Daha sonra, zlti 90 °C'de 40 dakika boyunca bir sonikatör kullanılarak hidrolize edilmiştir. 700 µl ekstraksiyon zcs eklendikten sonra örnekler 22400 ×g'de 5 dakika santrifüjlenmiş ve berrak süpernatant LC-MS/MS ile kantitatif analiz için kullanılmıştır.

#### *Ekstraksiyon verimi*

Ekstraksiyon verimi son ürünlerde yapılan analizler sonucunda, üzücü olarak etanolün kullanıldığı ekstraktta elde edilen toplam bireysel fenolik madde miktarı üzerinden hesaplanmıştır. Ekstraksiyon verimi, aşağıdaki Eşitlik 1 kullanılarak belirlenmiştir (Pereira vd., 2016; Dumitraşcu vd., 2019; Kutlu, 2019):

$$Y (\%) = \frac{TBFM_i}{TBFM_0} \times 100 \quad (1)$$

Bu denklemde;

Y: Verim, TBFM<sub>0</sub>: Derin ötektik çözücü ile ekstrakte edilen numunenin toplam bireysel fenolik madde miktarıdır. TBFM<sub>0</sub>: Etanol ekstraktının toplam bireysel fenolik madde miktarıdır.

### İstatistiksel analiz

Bulgulara yönelik istatistiksel analizler MINITAB 15.1.1.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bağımlı değişkenler arasındaki farklılık, ANOVA-Tukey testi ile %95 güven aralığında belirlenmiştir. Tüm analizler 2 tekerrür ve 2 paralel olarak yapılmıştır.

### BULGULAR VE TARTIŞMA

**Derin ötektik çözücülerin TFM, TFlaM, CUPRAC, CERAC ve DPPH• verimine etkisi**  
Portakal kabuklarına farklı çözücüler ile yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlarda belirlenen TFM, TFlaM, CUPRAC, CERAC ve DPPH• değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Ekstraktların TFM değerlerine bakıldığında, istatistiksel olarak en yüksek değer su ile (No 7) sağlandığı ve bunu etanol (No 6) ve metanolün (No 5) takip ettiği saptanmıştır. Derin ötektik

çözücüler ile elde edilen ekstraktların TFM değerleri kontrol gruplarına göre oldukça düşük bulunmuştur. Derin ötektik çözücüler kendi aralarında değerlendirildiğinde, 137.95 mg GAE/100 g kuru madde değeriyle en yüksek değer kolin klorür:gliserol kombinasyonu (No 1) ile istatistiksel olarak en düşük değerler ise 32.95 mg GAE/100 g kuru madde değeriyle kolin klorür:asetik asit (No 3) ve 14.81 mg GAE/100 g kuru madde değeriyle kolin klorür:üre (No 4) kombinasyonlarıyla belirlenmiştir. En yüksek TFlaM değerleri, kolin klorür:gliserol (No 1) ve su (No 7) kullanılarak elde edilen ekstraktlarda saptanmış olup, bu koşullarda değerler sırasıyla 45.95 ve 46.47 mg KE/100 g kuru madde olarak bulunmuştur. En düşük TFlaM miktarı ise 28.08 mg KE/100 g kuru madde değeri ile kolin klorür:asetik asit (No 3) kombinasyonunda elde edilmiştir. Antioksidan aktivite değerleri incelendiğinde, CUPRAC yöntemi ile kontrol grubunda (metanol-No 5) en yüksek değer bulunurken, CERAC ve DPPH• yöntemleri ile derin ötektik çözücü (kolin klorür:laktik asit-No 2) ile en yüksek değerlere erişilmiştir.

Çizelge 2. Farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların biyoaktif bileşik içerikleri

Table 2. Bioactive compound contents of extracts obtained with different solvents

No	TFM (mg GAE/100 g kuru madde) TPC (mg GAE/100 g dry matter)	TFlaM (mg KE/100 g kuru madde) TFC (mg QE/100 g dry matter)	CUPRAC (mg TE/100 g kuru madde) CUPRAC (mg TE/100 g dry matter)	CERAC (mg TE/100 g kuru madde) CERAC (mg TE/100 g dry matter)	DPPH• (mg TE/100 g kuru madde) DPPH• (mg TE/100 g dry matter)
1	137.95±0.01 <sup>d</sup>	45.95±0.01 <sup>a</sup>	35.30±0.01 <sup>c</sup>	284.01±0.15 <sup>bc</sup>	33.29±0.03 <sup>ab</sup>
2	100.92±0.01 <sup>d</sup>	34.54±0.01 <sup>c</sup>	20.11±0.00 <sup>e</sup>	442.61±0.33 <sup>a</sup>	38.13±0.02 <sup>a</sup>
3	32.95±0.02 <sup>e</sup>	28.08±0.01 <sup>d</sup>	30.60±0.00 <sup>d</sup>	329.49±0.25 <sup>b</sup>	32.50±0.00 <sup>b</sup>
4	14.81±0.00 <sup>e</sup>	31.80±0.00 <sup>c</sup>	39.65±0.02 <sup>b</sup>	303.53±0.28 <sup>bc</sup>	24.65±0.00 <sup>c</sup>
5	217.74±0.11 <sup>c</sup>	41.84±0.01 <sup>b</sup>	43.89±0.02 <sup>a</sup>	297.75±0.32 <sup>bc</sup>	32.18±0.03 <sup>b</sup>
6	340.74±0.22 <sup>b</sup>	32.42±0.01 <sup>c</sup>	36.51±0.01 <sup>bc</sup>	236.25±0.26 <sup>cd</sup>	29.88±0.02 <sup>bc</sup>
7	543.43±0.31 <sup>a</sup>	46.47±0.02 <sup>a</sup>	33.01±0.02 <sup>cd</sup>	187.83±0.18 <sup>d</sup>	32.90±0.01 <sup>ab</sup>

Aynı sütundaki farklı harflere ait (a, b, c, d, e) değerler istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ( $P < 0.05$ )

Values of different letters (a, b, c, d, e) in the same column are statistically different from each other ( $P < 0.05$ )

Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında derin ötektik çözücülerin en yüksek TFlaM, antioksidan aktivite (CERAC ve DPPH•) değerlerinin sağlanmasında etkili olduğu görülmüştür. TFM ve CUPRAC üzerine ise organik çözücüler kadar etkili olamamıştır. Literatür incelendiğinde, Ozturk vd. (2018) farklı molar oranlarda (1:2, 1:3 ve 1:4) hazırladıkları kolin klorür:gliserol ve kolin klorür:etilen glikol çözücülerini portakal kabuğundan TFM ekstraksiyonu için kullanmışlar ve istatistiksel olarak en yüksek TFM miktarlarının klorür:gliserol (1:2) ve kolin klorür:etilen glikol (1:4) ile elde edildiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada antioksidan aktivite üzerine ise en etkili derin ötektik çözücü kombinasyonunun klorür:gliserol (1:2) olduğu rapor edilmiştir. Viñas-Ospino vd. (2023) ise derin ötektik çözücüler ile verimin istatistiksel olarak düşük kalmasına rağmen, stabilitesinin yüksek olduğu ve bu nedenle bu çözücülerin kullanımının desteklenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Farklı olarak Pal ve Jadeja (2019), soğan kabuklarından polifenol ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerden yararlanmışlardır. En yüksek TFM ve antioksidan aktivite verimine kolin klorür:üre:su (1:2:4) kombinasyonunda erişilmiştir. Hidrojen bağ donörü olarak, Amid grubu olan ürenin soğan kabuğundan biyoaktif bileşik eldesinde geleneksel çözücülere alternatif olabileceği bildirilmiştir. Jeong vd. (2017) ise yeşil çaydan (*Camellia sinensis*) kateşin ekstraksiyonu için dokuz betain bazlı, sekiz sitrik asit bazlı ve dokuz gliserol bazlı derin ötektik çözücü dahil olmak üzere 26 farklı çözücüye test etmişlerdir. Elde edilen verilere göre, betain, gliserol ve D-(+)-glukoz karışımının (4:20:1 molar oran), diğer organik çözücülere kıyasla daha yüksek flavonoid madde verimi sağladığı belirlenmiştir. Bu bulgu bizim çalışmamızla da uyumludur.

#### **Derin ötektik çözücülerin bireysel fenolik bileşik profili üzerine etkisi**

Portakal kabuklarına farklı çözücüler ile yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlarda 28 farklı bireysel fenolik taraması yapılmış olup, saptanan değerler Çizelge 3'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en baskın fenolik bileşenin hesperidin olduğu belirlenmiştir. En yüksek hesperidin değeri, kolin klorür:gliserol (No 1)

kombinasyonu ile elde edilmiş olup, bu değer etanol (No 6) ve su (No 7) kullanılarak belirlenen değerlere göre sırasıyla 1.5 ve 4.1 kat daha fazla bulunmuştur. Metanol ekstraktında ise hesperidin bileşiği tespit edilememiştir. Hesperidin, turunçgillerde bol miktarda bulunan bir flavanon glikozit olup, antioksidan, antienflamatuar, antikarsinojenik ve antiaterjik etki göstermektedir (Garg vd., 2001; Parhiz vd., 2015). Ayrıca hesperidin bildiren antikarsinojenik etkilerinin, antioksidan ve antienflamatuar aktiviteleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Aggarwal vd., 2020). Bu bilgiler ışığında, derin ötektik çözücüler ile elde edilen ekstraktların bu bileşeni yüksek miktarda içermesi oldukça önemlidir. Tüm derin ötektik çözücülerde, organik çözücülere (etanol ve su) nazaran daha yüksek verimde elde edilmiştir. Toplam bireysel fenolik bileşik miktarları incelendiğinde, 486.35 ppm ile en yüksek değer çözücü olarak kolin klorür:gliserol (No 1) kombinasyonu kullanıldığında elde edildiği görülmektedir. Bu kombinasyonu, 464.68, 324.83, 118.41, 1.79, 1.73 ve 0.02 ppm değerleriyle sırasıyla kolin klorür:laktik asit (No 2), etanol (No 6), su (No 7), kolin klorür:üre (No 4), kolin klorür:asetik asit (No 3) ve metanol (No 5) takip etmektedir. Derin ötektik çözücüler ile elde edilen TFM değerlerinin geleneksel çözücülere göre daha düşük olmasına karşın, bireysel fenolik bileşik verimlerinin yüksek olması bu çözücülerin bazı polifenolik bileşiklere karşı çok daha seçici olduğunu göstermektedir. Benzer bulgular Ozturk vd. (2018) tarafından da bildirilmiştir.

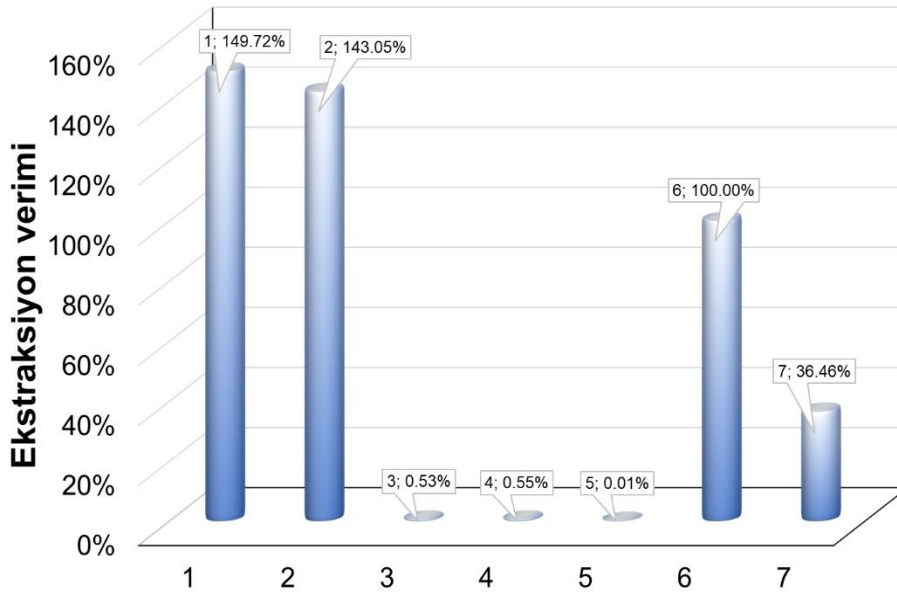
Farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimleri Şekil 1'de görülmektedir. Yöntem kısmında değinildiği üzere ekstraksiyon verimi hesaplanırken etanol (No 6) ile elde edilen toplam bireysel fenolik bileşik değeri (324.83 ppm) baz alınmıştır. Şekil 1 incelendiğinde, kolin klorür:gliserol (No 1) ve kolin klorür:laktik asit (No 2) kombinasyonlarının ekstraksiyon veriminin en yüksek olduğu belirlenmiştir. Derin ötektik çözücülerden kolin klorür:asetik asit (No 3) ve kolin klorür:üre (No 4) kombinasyonlarının ise portakal kabuğundan bireysel fenolik bileşik ekstraksiyonunda başarılı olamadığı ve verimin çok düşük kaldığı saptanmıştır.

Çizelge 3. Farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların bireysel fenolik bileşik miktarları  
 Table 3. Individual phenolic compound of extracts obtained with different solvents

Fenolik bileşik (ppm) Phenolic compounds (ppm)	1	2	3	4	5	6	7
(-)-Epicatechin	0.00206±0.00 002	0.00293±0.00 019	0.00279±0. 00022	0.00185±0. 00018	0.00381±0. 00032	0.02646±0.00 220	ND±ND
Apigenin	0.01891±0.00 178	0.01901±0.00 038	0.00145±0. 0002	0.00158±0. 00015	0.00128±0. 00023	0.06385±0.00 202	0.00573±0.0 0059
Artepillin C	0.00145±0.00 001	0.00134±0.00 023	0.00180±0. 00021	0.00151±0. 00017	0.00158±0. 00014	0.00376±0.00 012	0.00134±0.0 0020
Caffeic acid phenethyl ester	0.05388±0.00 195	0.04480±0.00 652	0.00355±0. 0001	0.00253±0. 00017	ND±ND	0.15926±0.00 772	0.02651±0.0 0251
Catechol	0.05745±0.00 173	0.03458±0.00 414	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.02366±0.00 249	0.04077±0.0 0844
Chlorogenic acid	0.00518±0.00 049	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.00688±0.0 0056
Chrysin	0.10939±0.00 398	0.10927±0.01 097	0.00627±0. 00077	0.00593±0. 00038	ND±ND	0.50047±0.01 832	0.03529±0.0 0057
Epicatechin gallate	0.01422±0.00 210	0.01672±0.00 079	0.00503±0. 00056	ND±ND	ND±ND	0.56024±0.04 098	0.00781±0.0 0017
Galangin	0.08026±0.00 858	0.06982±0.00 985	0.00767±0	0.00440±0. 00029	0.00814±0. 00083	0.23225±0.00 698	0.02396±0.0 0131
Gallic acid	0.00487±0.00 047	0.00768±0.00 054	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.03936±0.00 306	0.01412±0.0 0013
Gallocatechin+Epiga llocatechin	0.02044±0.00 072	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.11134±0.00 574	0.00754±0.0 0034
Hesperidin	484.98875±1 0.09868	463.42792±1 8.09361	1.69281±0. 23536	1.76556±0. 06223	ND±ND	321.38156±1 8.26524	117.07681±1 .36424
Hyperosid	0.19547±0.01 084	0.19241±0.00 514	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.21041±0.00 640	0.15179±0.0 1051
Kaempferol	0.02026±0.00 382	0.01305±0.00 293	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.08425±0.00 259	0.03948±0.0 0441
Luteolin	0.04067±0.00 249	0.03213±0.00 223	0.00892±0. 00096	0.00518±0. 00029	0.00754±0. 00081	0.03097±0.00 162	0.00623±0.0 0036
Myricetin	0.00047±0.00 013	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.00387±0.00 003	ND±ND
Naringenin	0.03617±0.00 086	0.04370±0.00 075	0.00029±0. 00002	0.00028±0. 00006	ND±ND	0.04354±0.00 326	0.08298±0.0 0344
Neochlorogenic acid	0.00052±0.00 002	0.00882±0.00 073	0.00007±0. 00001	0.00020±0. 00003	ND±ND	0.00144±0.00 005	0.00271±0.0 0032
p-coumaric acid	ND±ND	0.00264±0.00 035	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND
Pinobanksin	0.18834±0.00 189	0.17514±0.00 385	0.00331±0. 00029	0.00168±0. 00008	ND±ND	0.28513±0.01 077	0.40092±0.0 1831
Pinocembrin	0.07091±0.00 331	0.06890±0.00 930	0.00198±0. 00022	0.00165±0. 00011	ND±ND	0.21695±0.00 867	0.03617±0.0 0058
Protocatechuic acid	0.05756±0.00 257	0.06487±0.00 395	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.36918±0.04 665	0.09654±0.0 0709
Quercetin	0.01475±0.00 235	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND
Quercitrin	0.00484±0.00 002	0.00563±0.00 113	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.01148±0.00 101	0.00155±0.0 0008
Rutin	0.28540±0.01 404	0.29642±0.00 838	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.36066±0.01 418	0.31463±0.0 2032
t-cinnamic acid	0.03959±0.00 421	0.04279±0.00 300	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.03558±0.00 239	0.03983±0.0 0175
Trans-caffeic acid	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND
Trans-ferulic acid	0.04218±0.00 069	ND±ND	ND±ND	ND±ND	ND±ND	0.07952±0.00 068	ND±ND
<i>Total</i>	486.35±10.1	464.68±18.1	1.74±0.2	1.79±0.1	0.02±0.0	324.84±18.3	118.42±1.4

\*ND: Tespit edilemedi. *Not detected.*





Şekil 1. Farklı çözücülerle elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimleri  
 Figure 1. Extraction yields of extracts obtained with different solvents

## SONUÇ

Kolin klorür bazlı 4 farklı derin ötektik çözücü ile organik çözücülerin (metanol, etanol ve su) ekstraksiyon verimleri karşılaştırıldığında, kolin klorür:gliserol ve kolin klorür:laktik asit kombinasyonlarının en yüksek değeri aldıkları görülmüştür. Derin ötektik çözücülerin en yüksek TFlaM, antioksidan aktivite (CERAC ve DPPH•) değerlerinin sağlanmasında istatistiksel olarak etkili olduğu, fakat TFM ve CUPRAC üzerine organik çözücüler kadar etkili olamadığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra bireysel fenolik bileşik belirlenmesinde kolin klorür:gliserol ve kolin klorür:laktik asit kombinasyonlarının özellikle hesperidin verime etkisinin yüksek olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, derin ötektik çözücüler portakal kabuğundan biyoaktif bileşik ekstraksiyonunda, spektrofotometrik analiz sonuçlarına göre organik çözücülere yakın değerler alsalar da bireysel fenolik bileşik eldesinde çok daha başarılı bulunmuşlardır. Yeni ve yeşil çözücü kategorisinde bulunan bu çözücülerin, gelecekte farklı gıda materyallerinden farklı fitokimyasal bileşiklerin ekstraksiyonunda organik çözücülere alternatif olabilecekleri düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir (Proje No: 1919B012304269).

## KAYNAKLAR

Aggarwal, V., Tuli, H. S., Thakral, F., Singhal, P., Aggarwal, D., Srivastava, S., Pandey, A., Sak, K., Varol, M., Khan, A., Sethi, G. (2020). Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5):486-497.

Anonim, 2023. Ürün Raporu Turunçgiller 2022. Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/> Erişim tarihi: 20.05.2023.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26):7970-7981.

- Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O. E., Asker, D.Y.M.M., Youssef, M.M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2):410-427.
- Caldeira, C., De Laurentiis, V., Corrado, S., van Holsteijn, F., Sala, S. (2019). Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: A mass flow analysis. *Resources, Conservation and Recycling*, 149:479-488.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34:540-560.
- Chen, J., Li, Y., Wang, X., Liu, W. (2019). Application of deep eutectic solvents in food analysis: A review. *Molecules*, 24(24):4594.
- Corrado, S., Caldeira, C., Eriksson, M., Hanssen, O.J., Hauser, H.E., van Holsteijn, F., Liu, G., Östergren, K., Parry, A., Secondi, L., Stenmarck, A., Sala, S. (2019). Food waste accounting methodologies: Challenges, opportunities, and further advancements. *Global Food Security*, 20:93-100.
- Çelik, S., Kutlu, N., Gerçek, Y. C., Bayram, S., Pandiselvam, R., Bayram, N. E. (2022). Optimization of ultrasonic extraction of nutraceutical and pharmaceutical compounds from bee pollen with deep eutectic solvents using response surface methodology. *Foods*, 11(22):3652.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.J., Verpoorte, R. Choi, Y.H. (2013a). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766:61-68.
- Dai, Y., Witkamp, G.J., Verpoorte, R., Choi, Y.H. (2013b). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Analytical Chemistry*, 85(13):6272-6278.
- Dumitraşcu, L., Enachi, E., Stănciuc, N., Aprodu, I. (2019). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from cornelian cherry fruits using response surface methodology. *CyTA-Journal of Food*, 17(1):814-823.
- Ecem Bayram, N., Canli, D., Gerçek, Y.C., Bayram, S., Celik, S., Güzel, F., Morgil, H., Oz, G. C. (2020). Macronutrient and micronutrient levels and phenolic compound characteristics of monofloral honey samples. *J. Food Nutr. Res.*, 59:311-322
- Ecem Bayram, N., Gerçek, Y.C., Çelik, S., Mayda, N., Kostić, A.Ž., Dramićanin, A.M., Özkök, A. (2021). Phenolic and free amino acid profiles of bee bread and bee pollen with the same botanical origin—similarities and differences. *Arab. J. Chem.*, 14(3):103004.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K. (2001). Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*, 15(8):655-669.
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., Ebrahimzadeh, M.A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(3):277-281.
- Gómez-Urios, C., Viñas-Ospino, A., Puchades-Colera, P., López-Malo, D., Frígola, A., Esteve, M.J., Blesa, J. (2022). Sustainable Development and Storage Stability of Orange By-Products Extract Using Natural Deep Eutectic Solvents. *Foods*, 11(16):2457.
- Güzel, M., Akpınar, Ö. (2017). Turunçgil kabuklarının biyoaktif bileşenleri ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(2):153-167.
- Hashmi, S.H., Ghatge, P., Machewad, G.M., Pawar, S. (2012). Studies on extraction of essential oil and pectin from sweet orange. *J. Food Proc. Tech.*, 1(5):1-3.
- Hayyan, M., Hashim, M.A., Al-Saadi, M.A., Hayyan, A., AlNashef, I.M., Mirghani, M.E.S. (2013). Assessment of cytotoxicity and toxicity for phosphonium-based deep eutectic solvents. *Chemosphere*, 93:455-459.

- Ince, A. E., Sahin, S., Sumnu, G. (2014). Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *Journal of Food Science and Technology*, 51:2776-2782.
- Jeong, K.M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Han, S.Y., Lee, J. (2017). Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *Journal of Cleaner Production*, 151:87-95.
- Kaynarca, G.B., Aşkın, B. (2020). Portakal kabuğunun farklı yöntemlerle kurutulması ve bazı teknolojik özelliklerinin incelenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10(4):2604-2617.
- Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O., Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2):851-858.
- Kringel, D.H., Dias, A.R.G., Zavareze, E.D.R., Gandra, E.A. (2020). Fruit wastes as promising sources of starch: Extraction, properties, and applications. *Starch-Stärke*, 72(3-4):1900200.
- Kutlu, N. (2019). Kızılcık meyvesinden (*Cornus mas*) ohmik destekli mikrodalga ve ultrasonik yöntemleri ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, s. 49.
- Kutlu, N., Yılmaz, M.S., İşci, A., Şakıyan, Ö. (2021). Gıdalardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin kullanımı. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10(2):591-597.
- Lagha-Benamrouche, S. Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50:723-730.
- Lin, L. (2022). Phenolic acid extraction from orange peel with natural deep eutectic solvents. *In Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2321, No. 1, p. 012020). IOP Publishing.
- Madhu, B., Srinivas, M.S., Srinivas, G., Jain, S.K. (2019). Ultrasonic technology and its applications in quality control, processing and preservation of food: A review. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 32(5):1-11.
- Mbous, Y.P., Hayyan, M., Hayyan, A., Wong, W.F., Hashim, M.A., Looi, C.Y. (2017). Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering-Promises and challenges. *Biotechnology Advances*, 35(2):105-134.
- Ozturk, B., Parkinson, C., Gonzalez-Miquel, M. (2018). Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Separation and Purification Technology*, 206:1-13.
- Özyurt, D., Demirata, B., Apak, R. (2007). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement. *Talanta*, 71(3):1155-1165.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C. (2014). Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5):1063-1071.
- Pal, C.B.T., Jadeja, G.C. (2019). Deep eutectic solvent-based extraction of polyphenolic antioxidants from onion (*Allium cepa* L.) peel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4):1969-1979.
- Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*, 29(3):323-331.
- Pereira, R.N., Rodrigues, R.M., Genisheva, Z., Oliveira, H., de Freitas, V., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2016). Effects of ohmic heating on extraction of food-grade phytochemicals from colored potato. *LWT*, 74:493-503.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3):207-216.
- Plaskova, A., Mlcek, J. (2023). New insights of the application of water or ethanol-water plant extract

- rich in active compounds in food. *Frontiers in Nutrition*, 10:1118761.
- Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28:49–55.
- Smith, E.L., Abbott, A.P., Ryder, K.S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21):11060-11082.
- Stancu, V., Haugaard, P., Lähteenmäki, L. (2016). Determinants of consumer food waste behaviour: Two routes to food waste. *Appetite*, 96:7-17.
- Szabo, M., Idițoiu, C., Chambre, D., Lupea, A.J.C.P. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical Papers*, 61(3):214-216.
- Temirbekova, A. (2019). Farklı oranlarda portakal kabuğu ekstraktı kullanılarak fonksiyonel kurut üretimi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek lisans tezi, s. 6-9.
- TÜİK, 2023. Türkiye İstatistik Kurumu, (<http://www.tuik.gov.tr>).
- Viñas-Ospino, A., Panić, M., Bagović, M., Radošević, K., Esteve, M.J., Redovniković, I.R. (2023). Green approach to extract bioactive compounds from orange peel employing hydrophilic and hydrophobic deep eutectic solvents. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 31:100942.
- Xu, G.C., Ding, J.C., Han, R.Z., Dong, J.J., Ni, Y. (2016). Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Bioresource Technology*, 203:364-369.
- Zhang, L., Wang, M. (2017). Optimization of deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita* Thunb. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95:675-681.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4):555-559.
- Zhou, L., Luo, J., Xie, Q., Huang, L., Shen, D., Li, G. (2023). Dietary fiber from navel orange peel prepared by enzymatic and ultrasound-assisted deep eutectic solvents: Physicochemical and prebiotic properties. *Foods*, 12(10):2007.

## INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ENZYME APPLICATION ON THE STRUCTURE OF WAFERS IN THE FOOD INDUSTRY

Fatmanur POYRAZ EKINCI, Nagihan KÖKYAR\*, Dilek SENER

Elvan Food Ind. Co., İstanbul, Türkiye

Received/Geliş: 31.05.2024; Accepted/Kabul: 25.09.2024; Published online/Online baskı: 28.09.2024

Poyraz Ekinci, F., Kökyar, N., Sener, D. (2024) Investigation of the effect of enzyme application on the structure of wafers in the food industry. GIDA (2024) 49 (5) 946-959 doi: 10.15237/gida.GD24056

Poyraz Ekinci, F., Kökyar, N., Sener, D. (2024) Enzim uygulamasının gıda endüstrisinde gofretlerin yapısı üzerindeki etkisinin incelenmesi. GIDA (2024) 49 (5) 946-959 doi: 10.15237/gida.GD24056

### ABSTRACT

The study aimed to assess the impact of 13 different enzymes, including protease, amylase, hemicellulase, and xylanase, on wafer dough and sheets, aiming to identify the most effective enzyme combination. Commercial protease, amylase, hemicellulase, and xylanase enzymes were applied to wafer dough following manufacturer instructions, and their flow behaviors were analyzed. Subsequently, the doughs were baked into wafer sheets, and various parameters such as water activity ( $a_w$ ), moisture content (%), weight loss (%), color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), hardness (g), and sensory attributes were evaluated. Protease 4, Hemicellulase 2, and Xylanase 2 enzymes were selected for combination testing based on the analysis of flow behavior and characterization parameters of the wafer doughs. Among the tested combinations, the wafer dough containing 80 ppm Xylanase 2 + 300 ppm Protease 4 enzyme group exhibited promising potential for industrial applications due to its favorable flow behavior, while the resulting wafer sheets demonstrated desirable crispness and a brown-caramel color, suggesting suitability for commercial use.

**Keywords:** Wafer sheet, enzyme, protease, amylase, hemicellulase, xylanase

## ENZİM UYGULAMASININ GIDA ENDÜSTRİSİNDE GOFRETLERİN YAPISI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN İNCELENMESİ

### ÖZ

Çalışmanın amacı proteaz, amilaz, hemiselülaz ve ksilanazdan oluşan 13 farklı enzimin gofret hamur ve plakasına olan etkisinin incelenmesi ve etkili olan enzim kombinasyonunun belirlenmesidir. Bu amaçla üreticinin talimatlarına göre belirlenen dozlarda denenen ticari proteaz, amilaz, hemiselülaz ve ksilanaz enzimleri gofret hamuruna uygulanmış ve akış davranışları incelenmiştir. Daha sonrasında pişirilerek gofret plakası haline getirilen hamurların su aktivitesi, nem (%), ağırlık kaybı (%), renk parametreleri ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), sertlik (g) ve duyu analizi gerçekleştirilmiştir. Gofret hamurlarının akış davranışları ve karakterizasyon parametreleri değerlendirildiğinde Proteaz 4, Hemiselülaz 2, Ksilanaz 2 enzimleri kombinasyon olarak denemek üzere seçilmiştir. Denenen kombinasyonlar arasından 80 ppm Ksilanaz 2 + 300 ppm Proteaz 4 enzim grubu içeren gofret hamuru akış davranışı, gofret plakası ise gevrekliği ve kahverengi- karamel rengi dolayısıyla endüstride kullanılmak üzere potansiyel göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Gofret yaprağı, enzim, proteaz, amilaz, hemiselülaz, ksilanaz

\* Corresponding author/ Sorumlu yazar

✉: nagihan.elkus@elvan.com.tr

☎: (+90) 212 592 32 00

Fatmanur Poyraz Ekinci; ORCID no: 0000-0001-7679-4765

Nagihan Kökyar; ORCID no: 0009-0002-3197-9277

Dilek Sener; ORCID no: 0009-0004-3662-0137

### INTRODUCTION

Chemical additives and/or physical methods are generally used to produce improved bakery products. Physical methods are easy and cost-effective, including heat and humidity treatments, freezing and ultra-pressure treatments, while chemical methods involve the incorporation of functional groups into starch molecules through processes such as etherification, esterification, crosslinking and acid treatment. In recent years, microbial-based enzymes have started to replace chemical and physical methods as they are recognized as natural and safe by both the environment and food manufacturers. This is due to the fact that enzyme-catalyzed reactions are substrate-specific and occur easily under suitable conditions (Zhou et al., 2014; Park et al., 2018).

Different enzymes such as amylase, protease, hemicellulase and xylanase are used in the food industry to improve dough properties and product quality of bakery products (Zhou et al., 2014; Park et al., 2018; Stemler et al., 2023; Barrera et al., 2016). Enzymes used in the food industry represent the largest share of the enzyme market (Park et al., 2018).

Amylase, one of the most valuable enzymes in the industry, has the ability to hydrolyze starch molecules into polymers containing glucose units (Barrera et al., 2016; Ahmad et al., 2019). In bakery products,  $\alpha$ -amylase is generally used to improve textural properties and reduce elasticity. Mechanical damage during wheat milling affects starch granule integrity. Damaged starch granules have a higher water absorption capacity compared to natural starch granules. This negatively affects the rheological behavior of the dough and the quality of the products. Damaged starch granules are more hydrolyzed than natural starch granules due to their sensitivity to the enzyme  $\alpha$ -amylase.  $\alpha$ -amylase enzyme helps to reduce the negative effect of damaged starch granules (Barrera et al., 2016).

Proteases, one of the most frequently used enzymes in the bakery industry, refer to a group of enzymes whose catalytic function is to hydrolyze the peptide bonds of proteins (Jabalia

et al., 2014). Proteases are used to ensure contact with flour proteins with shortened chain length during the dough fermentation phase (Philipps-Wiemann, 2018). Protease treatment of the dough makes it easier to process the dough and results in a wider range of products. In addition, mixing time is shortened and energy input to the process is reduced. Additional benefits of proteases are improved pan flow, grain and crumb texture, water absorption, color and taste in products such as wafers (Stauffer CE, 1987; Lindahl L, 1992).

Hemicellulases, another enzyme used in industry, consist of a group of enzymes that are effective in the hydrolysis of hemicelluloses, a complex polysaccharide group. Since xylan is the largest component in the hemicellulose structure, endoxylanases are one of the most important hemicellulosic enzymes. Xylanases are used to improve the gluten structure of bread, dough volume, viscosity, softness and elasticity, and to improve texture, taste and flavor in biscuit production. Hemicellulases are mostly used in the baking industry and in the production of prebiotic oligosaccharides (de Souza and Kawaguti, 2021; Pandit B, 2023).

Wafer, one of the most consumed bakery products, requires a low-protein, soft wheat flour with a weak gluten structure that allows it to be molded correctly. The protein levels of flours and the amount of damaged starch significantly affect the water absorption of flours. Hard wheats contain more protein and undergo more starch damage when milled. Soft wheats, on the other hand, contain less protein and suffer less starch damage during milling. Thus, the water holding capacity of flour made from soft wheat is lower. If strong flour is used in wafer production in the industry, the dough lumps during the process due to the gluten network formation of the flour, clogging the pipes and depositor, making mixing difficult. In addition, it was observed that wafers prepared with strong flour formed irregular shapes due to their hard texture. The water holding capacity and gluten network of wheat also affect the viscosity of the wafer batter. It is ensured that the wafer prepared with weak flour with low water holding capacity spreads

sufficiently on the cooking plate and the product is crispy as desired by the consumer. For this purpose, both environmentally friendly and flexible product enzymes are used in wafer production to provide the desired texture and viscosity (D. Manley, 2011; Jabalia et al., 2014; Barrera et al., 2016; Ahmad et al., 2019; S. Ahmad et al., 2022; Naderi, B. et al., 2023).

Wafer is a light, thin and crispy product obtained by pouring the liquid dough between the heating plates and baking it quickly. Although the term wafer is used for the product group consisting of plain wafers, hollow wafers, cones, wafer bars, plain wafer sheets will be evaluated in this study. In this study, Elvan Gıda (Istanbul, Turkey) aimed to determine the enzyme or enzyme combinations

that facilitate the workability of wafer dough during the production process and provide crunchy properties.

## MATERIAL METHOD

### Material

The wafer wheat flour used in the study was purchased from Ulusoy Un Ticaret A.Ş., palm oil from Cargill, Incorporated, soy lecithin from Archer Daniels Midland Company, sodium bicarbonate from Sisecam Soda Lukavac, natural cocoa powder from Altınmarka Gıda San. ve Tic. A.Ş., edible salt from Med-Mar Tuz San. Tic. A.Ş. The enzymes used in the study, their sources, strengths and amounts used in the studies are given in Table 1 according to their groups.

Table 1. Enzymes used in the study, their sources, potencies and amounts used in the studies

Usage amount	Enzyme	Enzyme source and power
300 ppm	Protease 1	Bacterial protease, 9-11 u/g
	Protease 2	Bacterial protease, 120 u/g
	Protease 3	Fungal protease, 227 UHb/g
	Protease 4	Bacterial protease, 1126 UHb/g
15 ppm	Amylase 1	Fungal amylase, 378000 -462000 u/g
	Amylase 2	Fungal gluco-amylase, 5400-6600 u/g
	Amylase 3	Fungal alpha-amylase, 1728 AZ/g
125 ppm	Hemicellulase 1	Fungal hemicellulase, bacterial hemicellulase, 1650 u/g
	Hemicellulase 2	Fungal hemicellulase, 3420-4180 u/g
	Hemicellulase 3	Fungal hemicellulase, 1650 u/g
80 ppm	Xylanase 1	Microbial xylanase, 170000-230000 u/g
	Xylanase 2	Bacterial xylanase, 568 XylH/g
	Xylanase 3	Fungal xylanase, 1700 XylH/g

## Method

### Characterization of wafer flour

In order to analyze the effect of the wafer flour used in the study, moisture content (%), protein content (%), gluten index (%) and ash content (%) were determined.

### Determination of moisture content

Moisture content determination of the wafer flour used in the study was carried out with Precisa XM 60 moisture analyzer. The moisture content of wafer flour was determined according to the method 930.15 (AOAC, 2000).

### Protein content determination of wafer flour

Protein content determination of wafer flour was carried out by Kjeldahl method with Buchi KjelFlex K-360. Protein content was calculated according to the following formula (AOAC International, 2000).

$$\left\{ \frac{(V_{H_2SO_4} \times 14 \times 2 \times 0.1)}{m} \right\} 1000 \times 100 = \% \text{ Nitrogen content}$$

$$\% \text{ Nitrogen content} \times 6,25 = \text{Protein content} (\%)$$

### Total wet gluten, dry gluten and gluten index

The total wet gluten, dry gluten and gluten index of wafer flour was determined according to the

method 38-12.02 (AOAC, 2000). After centrifugation, the amounts of weak gluten (a) in the small chamber and strong gluten (b) in the large chamber were weighed separately and noted. Total wet gluten was dried for 4 min and weighed (d). They was calculated according to the following formula.

$$(a + b) \times 10 = \text{Total Wet Gluten (c)}$$

$$(d) \times 10 = \text{Dry gluten}$$

$$(b / c) \times 100 = \text{GI (Gluten Index)}$$

#### *Ash determination*

The gluten index of wafer flour was determined according to the method 942.05 (AOAC, 2000). Considering the moisture content of the wafer flour, the % ash content was determined according to the formula given below. The studies were carried out in two parallels.

$$\% \text{Ash (m/m)} = \left[ \frac{(M2 - M0)}{M1} \times 100 \right] \times \left[ \frac{100}{(100 - N)} \right]$$

#### *Preparation of wafer batter*

The formulation of the wafer dough used in the study is given in Table 2. According to the formulation given in Table 2, salt and sodium bicarbonate were homogenized in the specified amount of water, then wafer wheat flour, palm oil, soy lecithin and natural cocoa powder were added and homogenized with a hand blender (Tefal Eco Respect Powelix 600W, France) for 60 seconds. Then, the determined amount of enzymes were added to the wafer dough prepared separately for each enzyme and mixed with a hand blender for 30 seconds.

Table 2. Formulation of the wafer dough used in the study

Ingredient	Concentration (%)
Water (g)	55.272
Wafer wheat flour (g)	42.517
Palm oil (g)	1.275
Soy lecithin (g)	0.425
Natural cocoa powder (g)	0.170
Sodium Bicarbonate (g)	0.170
Salt (g)	0.170
Total (g)	100

In order to examine the effect of the enzymes supplied from the market on the wafer sheets, the manufacturer's recommended doses were taken

into consideration for each enzyme group used in the study.

From the wafer dough prepared with different enzymes, 10 ml was drawn using an Ayset brand injector and weighed. Afterwards, 10 ml of wafer batters taken with the injector were cooked at 180°C for 150 seconds in a wafer plate cooker (Çiftçiöğlü Makina, Türkiye) heated at 180°C for 30 minutes. After the baking was completed, the wafers were cooled at room temperature for 15 minutes and weighed with a balance and the weight loss due to baking was calculated.

#### *Flow behavior of wafer batter (s)*

Although viscosity can vary over time, it is the resistance of a substance to flow that indicates the quality of a fluid (Abbas et al., 2010). In this study, flow behavior measurements were carried out in order to correlate the dough viscosity changed by the effect of enzyme with the friability of wafer sheets. The flow behavior of the wafer batters was evaluated with the discharge times of the flow container viscometer as suggested in Altinok, E., et al (2022). After the wafer batters prepared with different enzymes were homogeneously prepared, the flow time at 0 minute was measured and recorded in seconds with a UVE DIN 8 mm handle cup at 25 °C. At 30 minutes after the dough was prepared, the flow times were measured and recorded again with a UVE DIN 8 mm handled cup. The measurements were carried out in three repetitions.

#### *Characterization of the wafer sheets*

In order to perform comparative characterization of the wafer sheets prepared with different enzymes, water activity, moisture content (%), weight loss (%), color parameters, hardness and sensory analysis were tested.

#### *Water activity (aw)*

In order to measure the water activity of wafer sheets produced with different enzymes, the samples were crushed into powder and filled up to the specified place of the plastic sample container of the water activity device. The sample container was placed in the relevant compartment in the device and the measurement was taken. The



experiment was carried out in 2 parallels. If the difference between the results of two parallel samples was more than 0.05, the measurement was repeated (AOAC International, 2000).

#### *Determination of moisture content*

In the study, the classical method was used to determine the moisture content of wafers produced with different enzymes. The study was carried out in 2 parallels. The result was calculated according to the following formula (AOAC International, 2000).

$$\% \text{dry matter (m/m)} = (M2 - M0) / M1 \times 100$$

M0: Weight of the glass petri dish

M1: Initial weight of the sample

M2: Weight of sample and glass petri dish after incineration

Moisture content (%) = 100 - % dry matter weight

#### *Weight loss (%)*

In order to measure the weight loss of the wafer sheets, the injector was used as a dough depositor. For this purpose, the injector was tared, 10 ml of wafer dough was drawn into the injector, weighed again with a precision balance and the value was recorded. The dough in the injector was then baked in the wafer machine and allowed to cool for 15 minutes. The cooked wafer sheets were weighed on a precision balance and the value was recorded. The studies were carried out in 3 parallels for each sample. Weight loss was determined by using the equation (1); (Berk et al., 2017).

$$\text{Weight loss (\%)} = 100 \times (W0 - W1) / W0 \quad (1)$$

W0: Weight of the wafer batter before baking

W1: Weight of the wafer sheet after baking

#### *Color parameters*

Color measurements of wafer sheets produced with different enzyme combinations and without enzyme were carried out with Konika Minolta brand color measuring device. The measurements were performed by touching the device directly to the product surface in 3 parallels for each sample. CIE L\* (lightness), a\* (redness) and b\* (yellowness) evaluation system was used to determine the color parameters (Sahin and Sumnu, 2006).

#### *Hardness*

The hardness of the wafer sheets was analyzed with CT3 Texture Analyzer 30 minutes after baking. For this purpose, the samples were placed centered on the apparatus of the texturing device. The TA40 probe (12 mm radius) was brought to the closest point to the sample so as not to touch the sample and the program was run. The results were recorded as hardness values in grams and the analyses were carried out in 3 parallels (AOAC International, 2000).

#### **Sensory analysis**

Sensory analysis test was performed on wafer sheets produced with and without different enzyme combinations. The wafer sheet samples numbered with three-digit random numbers were evaluated by 10 trained panelists aged between 25 and 42 years who were Elvan Gıda personnel. Panelists evaluated the samples for general liking using a 9-point hedonic test. Very much like=9, Not at all like=1 (Resurreccion, 2008).

#### **Statistical analysis**

The experimental data obtained throughout the study were evaluated by analysis of variance (ANOVA) to detect the significant differences in flour types and concentrations ( $p \leq 0.05$ ). If significant difference was found, Tukey's Test with 95% confidence level was performed for comparison. SPSS (Version 20, IBM, U.S.A.) was used in order to determine the Pearson correlation coefficients with 5% confidence level.

## **RESULT AND DISCUSSION**

### **Characterization of wafer flour**

In the food industry, technological recommendations for the quality of wafer production start with the quality of flour (Meleshkina E. P., 2016). In order to facilitate the processability of wafers in the process and to ensure homogeneous baking, wafers should be made from low protein soft wheat flour with a weak gluten structure (Naderi, B. et al., 2023). For this reason, in order to evaluate the effect of the wafer wheat flour used in the study on the results of the study, moisture content (%), protein content (%), gluten index (%) and ash content (%) analyzes were performed. According to the

analysis, the moisture content of wafer wheat flour was determined as 11.6%, protein content as 8.79%, gluten index as 92.6% and ash content as 0.51%.

E. P. Meleshkina et al. (2021) mentioned the values of the quality criteria of flour in the study of the application of the alveograph device in order to improve the requirements for the quality of flour for the production of wafer sheets. In the study, it is stated that the moisture content should not exceed 14.5%, while the wafer flour we used in our study is suitable for wafer use with a moisture content of 11.6%.

Although the nutritional quality of wheat protein is lower than that of other cereals, wheat flour is used as the primary source to form the desired structure in wafer. Soft wheat flour, which is also used in wafer flours, has more spreading properties than hard wheat flour. This is due to the low protein level, low water absorption and fineness of soft wheat flour. In studies in the literature, the protein content of soft wheat flour was reported to be between 8-10%, which is consistent with our study (Delcour et al., 2012). In addition, while the wet gluten content of soft wheat flour is reported to be between 23-24% in the literature, the wet gluten content of the flour we used in this study was 23.3%, which is in line with this range (Meleshkina, E. P. et al., 2021).

When starch and water-soluble proteins are washed out of the dough, most of the remaining viscoelastic mass contains water-insoluble protein fractions called gluten. These fractions are essential for industrial quality. Gluten plays an important role in determining the baking quality of wheat by imparting water holding capacity, stickiness, viscosity and elasticity (Oikonomou, N. A. et al., 2015). Gluten index is used to define whether gluten quality is poor (<30%), normal (=30-80%) or strong (>80%) (Cubadda, R. et al., 1992). The wafer flour used in the study had 23.5% wet gluten, 8.6% dry gluten and 92.6% gluten index, indicating that the flour had strong gluten quality.

Ash is one of the main indicators of the quality and utilization of wheat flour (Cardoso et al., 2019; Carson et al., 2009). Flour with high ash levels is generally characterized as less purified. Therefore, it is a commonly used parameter for determining flour purity and extraction rate (Piironen, V. and Salmenkallio-Marttila, 2009). According to Turkish Food Codex Wheat Flour Communiqué, ash value is not required for special purpose wheat flour. According to Elvan Food quality criteria, the ash value in wafer wheat flour should be maximum 0.6%. Therefore, the wafer wheat flour used in the study complies with Elvan Gıda quality criteria.

### **Flow behavior of wafer batter**

The viscosity of wafer dough varies depending on the components of the product, particle size of flour, water content and temperature (Xue, J. and Ngadi, M., 2006). According to the literature, by relating rheological results with hardness, it can be said that the increase in the viscosity of the wafer dough results in wafers with low hardness values (Altinok, E. et al., 2022). Based on the flow time of wafer batters, we can comment on the viscosity of the batters. The length of the flow time indicates the high water holding capacity and viscosity. In the wafer samples in our study, it was observed that high viscosity appeared with a decrease in hardness values in line with the literature.

The data on the flow times of the wafer doughs with and without enzymes from the viscometer container at 0 and 30 minutes after preparation are given in Table 3. The viscosities of commercial enzymes belonging to each enzyme group were statistically significant ( $P<0.05$ ). It was observed that Protease 4 enzyme provided significantly the lowest flow time at 0 and 30 minutes in wafer dough. This data is due to the fact that proteases break down peptide bonds as well as proline residues, which often occur in gluten proteins, increasing the solubility of proteins and decreasing viscosity. Compared to the original protein, the use of protease enzyme resulted in smaller peptides and fewer secondary structures, so the control group had higher viscosity values at 0 and 30 minutes compared to

the wafer doughs containing protease enzyme (Naderi, B. et al., 2023).

It was determined that none of the wafer doughs containing amylase enzyme could provide a decrease in flow time at the end of 30 minutes. In the literature, it is seen that the addition of alpha-amylase does not change the viscosity of the dough or increases the final viscosity (Hung, P. V. et al., 2007; Doğan, İ. S., 2002).

It was observed that the wafer dough containing hemicellulase 2 enzyme provided significantly

lower flow time at 30 minutes than the wafer dough containing other hemicellulase enzymes. Among the wafer doughs containing xylanase enzyme, it was observed that the wafer dough containing Xylanase 2 enzyme provided a significant decrease in the flow time from minute 0 to minute 30. As a control, it was observed that the wafer dough without enzyme had a high flow time compared to the wafer doughs containing enzyme at 0 and 30 minutes and there was no decrease in flow time after 30 minutes of waiting time.

Table 3. Flow behavior times of wafer doughs at 0 and 30

Enzyme	0. min flow time (s)	30. min flow time (s)
Protease 1	68±2 <sup>b</sup>	61±1 <sup>b</sup>
Protease 2	78±3 <sup>a</sup>	58±3 <sup>b</sup>
Protease 3	81±6 <sup>a</sup>	80±1 <sup>a</sup>
Protease 4	28±1 <sup>c</sup>	25±2 <sup>c</sup>
Amylase 1	95±4 <sup>a</sup>	101±4 <sup>a</sup>
Amylase 2	70±5 <sup>b</sup>	70±3 <sup>b</sup>
Amylase 3	61±8 <sup>b</sup>	61±3 <sup>c</sup>
Hemicellulase 1	139±3 <sup>b</sup>	138±6 <sup>b</sup>
Hemicellulase 2	52±6 <sup>c</sup>	49±3 <sup>c</sup>
Hemicellulase 3	227±3 <sup>a</sup>	225±6 <sup>a</sup>
Xylanase 1	100±5 <sup>c</sup>	90±1 <sup>b</sup>
Xylanase 2	140±9 <sup>b</sup>	43±6 <sup>c</sup>
Xylanase 3	158±4 <sup>a</sup>	220±5 <sup>a</sup>

Significantly different at  $P<0.05$  in the column for each enzyme group are lettered

#### Characterization of the wafer sheets

In order to examine the effect of enzymes on wafer sheets, the data of the characterization studies were examined. The data on the characteristics of the wafer sheets consisting of 13 different enzymes and a control group are given in Table 4. shows the aw, moisture content (%), loss (%), weight loss (%), hardness (g) and color parameter values of the wafer sheets containing the enzymes. All enzymes except hemicellulase 3 and xylanase 3 increased the hardness value of wafer sheets. Enzyme use increased weight loss. According to color measurement results, Protease 4 and xylanase 2 darkened the product color significantly.

#### Water activity (aw) and moisture content (%)

Protease enzymes break down proteins in the wafer layer, releasing amino acids and peptides. Amylase enzymes break down starch into simpler sugars. Hemicellulases and xylanases break down hemicellulose and xylan in plant material, releasing small molecules. Protein, starch and hemicelluloses, which are large molecules, retain more moisture. Therefore, the breakdown of these molecules can potentially release some bound water, which can increase the overall moisture content and water activity of the wafer layer (Troller, 2012). Moisture content, one of the most important factors of wafers, directly affects the basic textural properties of the product (Dogan, 2006).

## Effects of enzyme application on wafer structure

Table 4. The effect of enzymes on the characteristics of wafer sheets (Significantly different at  $P < 0.05$  in the column are lettered)

Enzyme	aw	Moisture content (%)	Weight loss (%)	Color parameters	Hardness (g)
Protease 1	0.178±0.001 <sup>i</sup>	2.51±0.001 <sup>e</sup>	60.55±0.040 <sup>de</sup>	68.08±0.030 <sup>i</sup> 3.49±0.020 <sup>d</sup> 25.67±0.030 <sup>d</sup>	681.7±0.500 <sup>e</sup>
Protease 2	0.164±0.002 <sup>j</sup>	2.66±0.010 <sup>d</sup>	60.51±0.220 <sup>def</sup>	70.91±0.010 <sup>d</sup> 1.23±0.030 <sup>fg</sup> 18.37±0.020 <sup>m</sup>	725.2±0.105 <sup>c</sup>
Protease 3	0.324±0.004 <sup>d</sup>	4.28±0.020 <sup>b</sup>	57.52±0.040 <sup>i</sup>	71.10±0.100 <sup>cd</sup> 0.90±0.100 <sup>g</sup> 20.21±0.020 <sup>i</sup>	674.8±0.200 <sup>f</sup>
Protease 4	0.217±0.004 <sup>h</sup>	2.26±0.060 <sup>f</sup>	61.31±0.035 <sup>c</sup>	54.19±0.040 <sup>l</sup> 9.70±0.200 <sup>a</sup> 27.86±0.020 <sup>c</sup>	926.7±0.491 <sup>a</sup>
Amylase 1	0.453±0.002 <sup>a</sup>	3.83±0.040 <sup>c</sup>	59.55±0.070 <sup>h</sup>	70.23±0.030 <sup>f</sup> 1.64±0.040 <sup>e</sup> 20.00±0.030 <sup>j</sup>	574.7±0.800 <sup>h</sup>
Amylase 2	0.449±0.001 <sup>a</sup>	4.41±0.010 <sup>b</sup>	60.17±0.065 <sup>g</sup>	67.00±0.040 <sup>j</sup> 4.87±0.020 <sup>c</sup> 28.47±0.060 <sup>b</sup>	524.66±0.509 <sup>j</sup>
Amylase 3	0.432±0.001 <sup>b</sup>	2.05±0.020 <sup>g</sup>	59.53±0.110 <sup>h</sup>	68.39±0.050 <sup>h</sup> 2.89±0.030 <sup>d</sup> 24.77±0.050 <sup>e</sup>	529.5±0.400 <sup>i</sup>
Hemicellulase 1	0.432±0.003 <sup>b</sup>	5.16±0.050 <sup>a</sup>	60.27±0.025 <sup>fg</sup>	72±0.020 <sup>a</sup> 1.38±0.050 <sup>ef</sup> 18.62±0.090 <sup>l</sup>	492±0.750 <sup>k</sup>
Hemicellulase 2	0.184±0.004 <sup>i</sup>	2.26±0.050 <sup>f</sup>	64.09±0.060 <sup>a</sup>	70.91±0.060 <sup>d</sup> 2.30±100 <sup>d</sup> 23.00±0.020 <sup>f</sup>	703±0.420 <sup>d</sup>
Hemicellulase 3	0.297±0.005 <sup>c</sup>	1.51±0.040 <sup>h</sup>	59.53±0.045 <sup>h</sup>	70.63±0.040 <sup>e</sup> 1.24±0.020 <sup>f</sup> 21.67±0.030 <sup>h</sup>	383.66±0.480 <sup>l</sup>
Xylanase 1	0.187±0.007 <sup>i</sup>	1.28±0.050 <sup>i</sup>	62.18±0.060 <sup>b</sup>	69.11±0.040 <sup>g</sup> 2.50±0.200 <sup>d</sup> 22.44±0.040 <sup>g</sup>	624±0.730 <sup>g</sup>
Xylanase 2	0.232±0.002 <sup>g</sup>	0.63±0.030 <sup>j</sup>	60.69±0.125 <sup>d</sup>	66.53±0.030 <sup>k</sup> 6.34±0.050 <sup>b</sup> 29.67±0.030 <sup>a</sup>	772.7±0.200 <sup>b</sup>
Xylanase 3	0.397±0.005 <sup>c</sup>	5.176±0.006 <sup>a</sup>	60.36±0.085 <sup>efg</sup>	71.05±0.020 <sup>c</sup> 2.21±0.010 <sup>d</sup> 22.39±0.040 <sup>g</sup>	353.33±0.060 <sup>m</sup>
Control	0.25±0.003 <sup>f</sup>	3.87±0.050 <sup>c</sup>	52.80±0.080 <sup>i</sup>	71.79±0.010 <sup>b</sup> 1.11±0.020 <sup>fg</sup> 19.48±0.040 <sup>k</sup>	327.5±0.0390 <sup>n</sup>

Table 4 shows the water activity and moisture content (%) values of enzyme added wafers. Water activity and moisture content of wafer sheets containing Protease 3, Amylase 2, Hemicellulase 1, Xylanase 3 enzymes were significantly higher than the control. Protease 1,

Protease 2, Protease 4, Hemicellulase 2, Xylanase 2 enzymes have significantly lower water activity and moisture content (%) values compared to the control.

The critical water activity value for the glass transition of the product at 20°C is 0.591. (Martínez-Navarrete et al., 2004). It is seen that the critical water activity value for the glass transition at which softening starts in all enzyme groups and control wafer sheets is lower than the critical water activity value. If the water activity exceeds the critical value for the glass transition, friability is lost (Tufan, 2018). One of the methods used to reduce the water holding capacity of flour is the addition of enzymes (Dogan, 2006).

### **Weight loss (%)**

Data on the weight loss of the wafer doughs used in the study are given in Table 4. When the results were evaluated statistically, it was seen that the control dough without enzyme had significantly less weight loss with 52.80% compared to the wafer doughs containing enzyme. At 0 and 30 minutes, the control dough, which had one of the highest flow behavior time values, retained more moisture than the enzyme-containing doughs, resulting in less weight loss during baking. Wafer sheets containing Hemicellulase 2, Xylanase 1, Protease 4, Xylanase 2 enzymes had the highest weight loss.

According to studies in the literature, the reason for the higher weight loss in the enzyme-free wafer sheets compared to the enzyme-containing wafer sheets is thought to be due to the higher gluten and protein content and lower viscosity of the dough due to the absence of enzymes. While the high water holding capacity of protein and gluten prevents the removal of water from the final product, the high viscosity prevents the water from rising to the surface and mixing with the atmosphere with pressure (Tufan et al., 2020; Naderi, B. et al., 2023).

### **Color parameters**

Maillard reactions due to amino acids and reducing sugars affect the brownness of wafer sheets prepared and cooked under the same conditions. The color data of the wafer sheets are given in Table 4. According to the table, the lightness index ( $L^*$ ) of the doughs prepared by adding enzyme was significantly lower than the control, while the redness index ( $a^*$ ) was

significantly higher in the enzyme added groups compared to the control. This is due to the fact that protease enzyme increases amino acids, while hemicellulase, xylanase and amylase enzymes increase reducing sugars (Tufan et al., 2020; Naderi, B. et al., 2023).

The redness value of the wafer sheet with the highest lightness value, Hemicellulase 1 enzyme added, was determined to be lower than the other groups. The lightness value of the wafer sheets with the highest redness value, the wafer sheet with the addition of Protease 4 enzyme, was determined to be lower than the other groups. The lightness value of the control wafer sheet is the highest value after the wafer sheet added with Hemicellulase 1.

### **Hardness**

Textural characteristics observed during biting or chewing, such as crispness, are one of the critical characteristics indicating the freshness of the wafer and are affected by wafer formulation and processing conditions (Altinok, E. et al., 2022). The crispness felt during the consumption of the wafer is characterized by the consumer as fresh and pleasant due to the sound it makes (Çarşamba, et al., 2018).

When we look at Tables 3 and 4, it is seen that the low flow behavior value is compatible with the high hardness value. It is seen that the wafer dough containing Protease 4 enzyme, which has significantly the lowest flow behavior values, gives the highest hardness value ( $P > 0.05$ ). Wafer doughs containing Xylanase 2, Protease 2, Hemicellulase 2 enzymes, which had the highest hardness value, showed similarly low flow behavior ( $P > 0.05$ ). It is seen that all enzymes used in the study have significantly higher hardness value and therefore friability compared to the control wafer sheet because the enzymes reduce the water holding capacity in the wafer dough. Similarly, Altinok, E. et al. (2022) observed that the decrease in flow behavior time was observed with an increase in hardness value.

### Sensory analysis

In this study, panelists sensory evaluated wafer sheets containing different enzymes. The data of the panelists' evaluation in terms of general taste are given in Figure 1.

According to the results of the sensory analysis test performed by the panel, it was determined that the samples containing Protease 4, Hemicellulase 2 and Xylanase 2 enzymes were the

most liked wafer sheets on average. Panelists stated that they considered crispness and brown caramel color formation in their evaluations. Similar to Aslam et al. (2014), it was observed that higher hardness value caused higher crispness and therefore more sensory appreciation. In addition, according to the sensory analysis results, it was determined that the most liked wafer sheets also had a significantly high redness index.

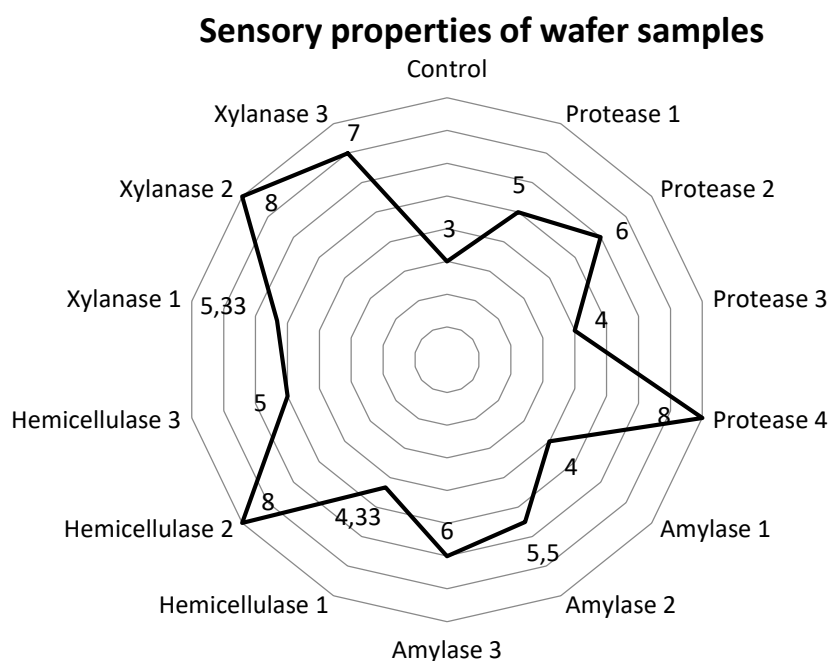


Figure 1. Effect of commercial enzymes on sensory appreciation of wafer sheets

### Characterization of Wafer Sheets Containing Enzyme Combinations

Protease 4, Hemicellulase 2 and Xylanase 2 enzymes were selected to be used in combinations in the next wafer sheet studies because they significantly reduced the dough flow behavior time at 30 minutes compared to 0 minutes, had significantly lower aw and moisture content (%) compared to the control, had significantly higher weight loss (%) compared to other enzymes, and produced the most sensory pleasing wafer sheets due to crispness and brown caramel color.

Data on the flow behavior times of wafer doughs containing combined enzyme groups are given in Table 5. When the dough flow behaviors of the

groups were examined, it was seen that the group containing only Xylanase 2+ Protease 4 enzyme combination had a significantly lower flow time of  $47 \pm 1.5$  seconds at 0 minute. At 30 minutes, the doughs containing Hemicellulase 2+ Xylanase 2+ Protease 4 and Xylanase 2+ Protease 4 groups had significantly similar lowest flow behavior time with  $11 \pm 1$  and  $13 \pm 2$  seconds. Hemicellulase 2+ Xylanase 2+ Protease 4 and Xylanase 2+ Protease 4 groups were determined as the most advantageous ones at the dough stage in the study we conducted in order to find the most advantageous enzyme group in terms of process ease and speed in industrial wafer production.

The data of the characterization studies of the combinations are given in table 6. When the hardness (g) values, which is an indicator of friability, of the wafer sheets containing the combinations with significantly similar weight loss were examined, it was observed that the Hemicellulase 2+ Xylanase 2 group was the

highest with  $735.5 \pm 0.370$  g, Hemicellulase 2+ Xylanase 2+ Protease 4 group had the second highest value with  $722.83 \pm 0.260$  g, while Hemicellulase 2+ Protease 4 and Xylanase 2+ Protease 4 groups had similarly the lowest values with  $715.66 \pm 0.290$  and  $714.5 \pm 0.250$ .

Table 5. Flow behavior times of wafer doughs containing combined enzyme groups at 0 and 30 minutes (Significantly different at  $P < 0.05$  in the columns are indicated by letters)

Enzyme combinations	0. min flow time (s)	30.min flow time (s)
Hemicellulase 2+ Xylanase 2	$55 \pm 1^a$	$23 \pm 1.5^b$
Hemicellulase 2+ Xylanase 2+ Protease 4	$53 \pm 1.5^a$	$11 \pm 1^c$
Hemicellulase 2+ Protease 4	$53 \pm 2.5^a$	$30 \pm 1.5^a$
Xylanase 2+ Protease 4	$47 \pm 1.5^b$	$13 \pm 2^c$

Table 6. The effect of the selected enzyme combinations on the characterization of wafer sheets (Significantly different at  $P < 0.05$  in the columns)

Enzyme combinations	aw	Moisture content (%)	Weight loss (%)	Color parameters	Hardness
Hemicellulase 2+ Xylanase 2	$0.349 \pm 0.004^a$	$5.01 \pm 0.230^a$	$60.66 \pm 0.140^a$	$68.00 \pm 0.500^a$ $1.79 \pm 0.040^d$ $13.50 \pm 0.520^d$	$735.5 \pm 0.370^a$
Hemicellulase 2+ Xylanase 2+ Protease 4	$0.258 \pm 0.007^b$	$2.58 \pm 0.190^c$	$60.86 \pm 0.050^a$	$67.40 \pm 0.400^a$ $3.11 \pm 0.030^c$ $19.78 \pm 0.170^c$	$722.83 \pm 0.260^b$
Hemicellulase 2+ Protease 4	$0.203 \pm 0.003^c$	$3.66 \pm 0.120^b$	$60.68 \pm 0.410^a$	$63.41 \pm 0.030^b$ $5.09 \pm 0.050^b$ $24.20 \pm 0.350^b$	$715.66 \pm 0.290^c$
Xylanase 2+ Protease 4	$0.155 \pm 0.075^d$	$3.67 \pm 0.050^b$	$60.8 \pm 0.800^a$	$58.54 \pm 0.090^c$ $7.31 \pm 0.200^a$ $26.81 \pm 0.350^a$	$714.5 \pm 0.250^c$

According to the analysis of color parameters, which is one of the factors affecting sensory evaluation, it was observed that the wafer sheets containing Hemicellulase 2+ Xylanase 2 and Hemicellulase 2+ Xylanase 2+ Protease 4 groups had the highest lightness index (L), while the wafer sheets containing Xylanase 2+ Protease 4 group had the highest redness index (a). Images of the wafer sheets containing the combined enzyme groups and the control wafer sheets without enzymes are given in Figure 2.

As determined in the color parameters analysis, the wafer sheet containing Xylanase 2+ Protease 4 group, which has the highest redness index as determined in the color parameters analysis, is

seen in an intense brown-caramel color in accordance with the image. In the sensory analysis test of the wafer sheets containing the combined enzyme groups by a panel of 10 people, it was observed that the wafer sheets containing the Xylanase 2+ Protease 4 enzyme group were significantly the most admired in the evaluation of the panelists considering the crispness and brown caramelized color.

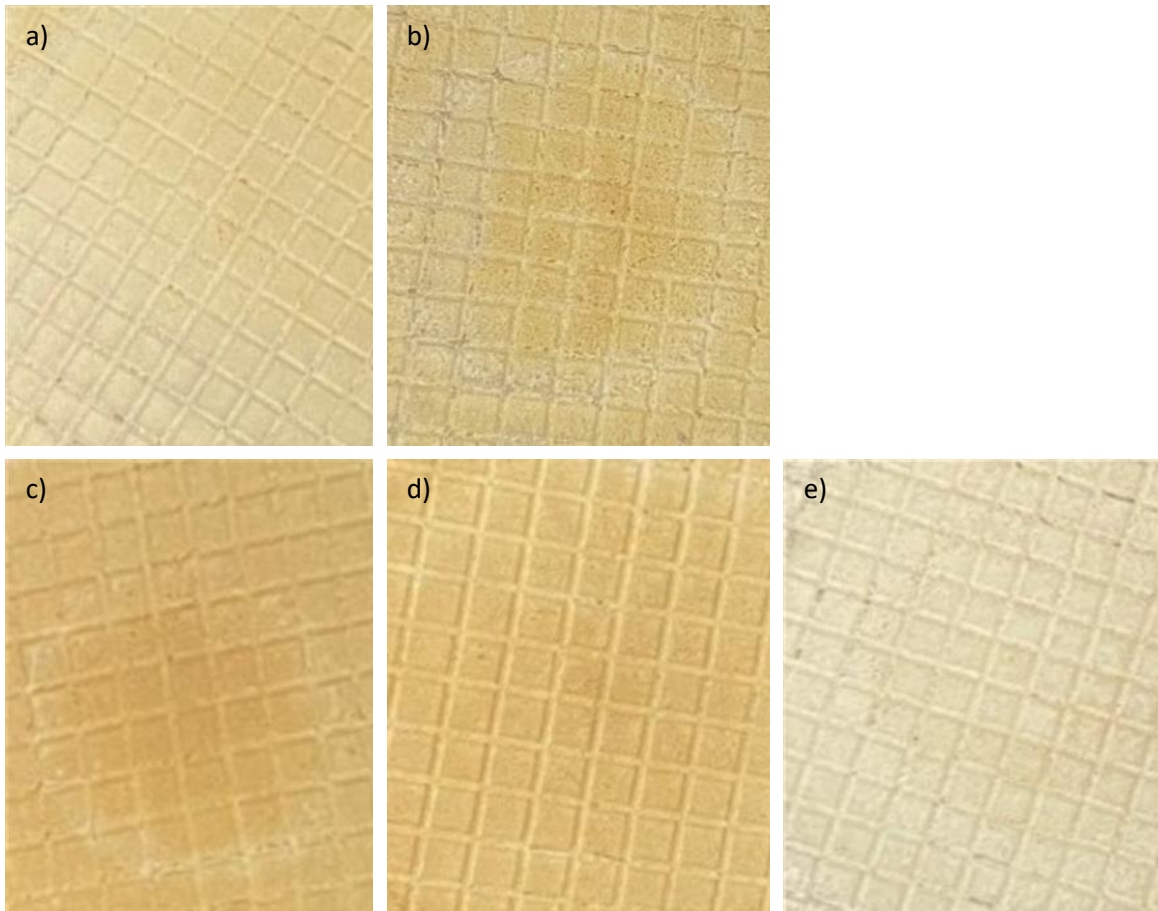


Figure 2. Images of wafer sheets containing combined enzymes and control group (a: Hemicellulase 2+ Xylanase 2, b: Hemicellulase 2+ Xylanase 2+ Protease 4, c: Hemicellulase

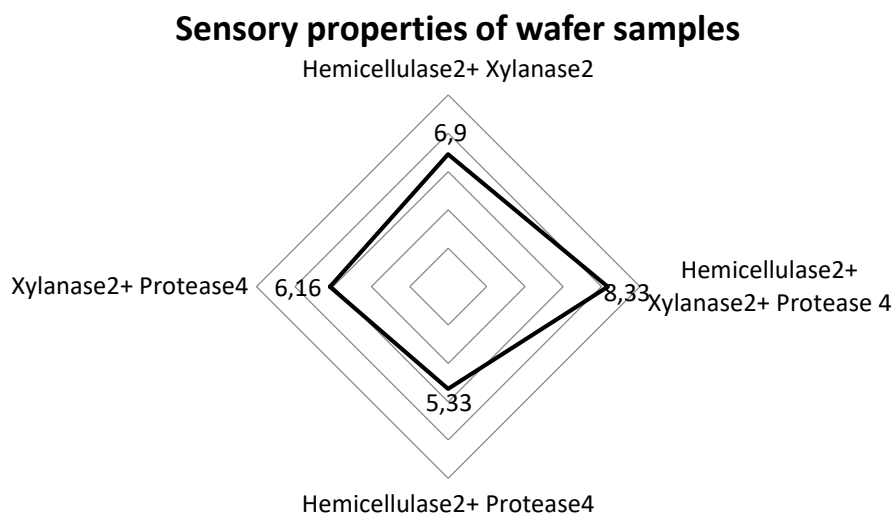


Figure 3. Effect of enzyme combinations on sensory appreciation of wafer sheets



## CONCLUSION

In the wafer industry, enzymes are used in order to make the depositor process easily and to save time and cost. For this reason, commercial protease, amylase, hemicellulase and xylanase enzymes, which have the potential to be used in the industry, were applied to wafer dough alone and in combination in our study. Protease 4, Hemicellulase 2, Xylanase 2 enzyme combinations were selected to be tested as a result of the characterization studies carried out in order to determine the effect of the applied enzymes on the processability, color, crispness and sensory appeal of the wafer dough. Among the tried enzyme combinations, 80 ppm Xylanase 2 + 300 ppm Protease 4 group was selected with the sensory desired crispness and brown-caramel color of the wafer sheet as well as the low flow time of the dough containing the group. Xylanase 2+ Protease 4 enzyme group, which reduces water holding capacity and viscosity by breaking down xylan and protein in wheat, is promising for use in industry.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declared that they have no actual, potential or perceived conflict of interest for this article.

## AUTHORS CONTRIBUTIONS

Fatmanur Poyraz Ekinci: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – Original Draft  
Nagihan Kökyar: Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Writing - Review & Editing; Dilek Şener: Conceptualization, Project administration, Supervision, Editing. All authors approved the final manuscript and accepted to be held responsible for the content.

## REFERENCES

Ahmad, M. A., Isah, U., Raubilu, I. A., Muhammad, S. I., Ibrahim, D., (2019) “An overview of the enzyme: Amylase and its industrial potentials”, *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 12(1), 352-358.

Altinok, E., Kurultay, S., Boluk, E., Atik, D. S., Kopuk, B., Gunes, R., Toker, O. S., (2022) “Investigation of using possibility of grape

pomace in wafer sheet for wheat flour substitution”, *International Journal of Food Science & Technology*, 57(6), 3634-3642.

Association of Official Analytical Chemists, (2000), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th Edition, Maryland.

Barrera, G. N., Tadini, C. C., León, A. E., Ribotta, P. D., (2016) “Use of alpha-amylase and amyloglucosidase combinations to minimize the bread quality problems caused by high levels of damaged starch”, *Journal of food science and technology*, 53, 3675-3684.

Berk, E., Şumnu, S. G., Şahin, S., (2017) “Effects of hydrocolloids and carob bean flour on rheological properties of batter and cake quality”, *Gıda*, 42(6), 754-762.

Cardoso, R.V.C., Fernandes, A., Heleno, S.A., Rodrigues, P., Gonzalez-Paramas, A.M., Barros, L., Ferreira, I., (2019) “Physicochemical characterization and microbiology of wheat and rye flours”, *Food Chemistry*, 280, 123–129.

Carson, G.R., Edwards, N.M., (2009) “Criteria of Wheat and Flour Quality”, *In Wheat: Chemistry and Technology; American Association of Cereal Chemists: St Paul, MN, USA*, pp. 97–118

Cubadda, R., Carcea, M., Pasqui, L.A., (1992) “Suitability of the gluten index method for assessing gluten strength in durum wheat and semolina”, *Cereal Foods World*, 37(12), 866–869.

Çarşamba, E., Duerrschmid, K., Schleining, G., (2018) “Assessment of acoustic-mechanical measurements for crispness of wafer products” *Journal of Food Engineering*, 229, 93–101.

Manley, D., (2011) “Wafer biscuits, in Manley’s technology of biscuits, crackers and cookies”, *Woodhead Publishing*, Sawston, pp.353–371.

de Souza, T. S., Kawaguti, H. Y., (2021) “Cellulases, hemicellulases, and pectinases: Applications in the food and beverage industry”, *Food and Bioprocess Technology*, 14(8), 1446-1477.

Delcour, J. A., Joye, I. J., Pareyt, B., Wilderjans, E., Brijs, K., and Lagrain, B., (2012) “Wheat gluten functionality as a quality determinant in

- cereal-based food products”, *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 469-492.
- Dogan, I.S., (2006), “Factors affecting wafer sheet quality”, *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 569–576.
- Doğan, İ. S., (2002), “Dynamic rheological properties of dough as affected by amylases from various sources”, *Food/Nahrung*, 46(6), 399-403.
- Hung, P. V., Maeda, T., Fujita, M., Morita, N., (2007), “Dough properties and breadmaking qualities of whole waxy wheat flour and effects of additional enzymes”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(13), 2538-2543.
- Jabalia, N., Mishra, P. C., Chaudhary, N., (2014), “Applications, challenges and future prospects of proteases: An overview”, *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*, 1(3), 179-183.
- Lindahl L, Eliasson A.C., (1992), “Influence of added enzymes on rheological properties of a wheat flour dough”, *Cereal Chemistry*, 69, 542-6.
- Meleshkina, E.P., (2016), “On new approaches to the quality of wheat flour”, *Production Quality Control*, 11, 13-18.
- Meleshkina, E.P., Kolomiets, S.N., Bundina, O.I., Cheskidova, A.S., (2021), “Application of the alveograph device for the development of requirements for the quality of flour for the production of a wafer sheet”, *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Volume 845, No. 1, p. 012135.
- Naderi, B., Nasabi, M., Akbari, M., Zargaraan, A., Amini, M., (2023), “Effect of enzymatic treatment on rheological properties of wafer batter and textural properties of wafer sheet”, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2213-2223.
- Oikonomou, N.A., Bakalis, S., Rahman, M.S., Krokida, M.K., (2015), “Gluten index for wheat products: Main variables in affecting the value and nonlinear regression model”, *International journal of food properties*, 18(1), 1-11.
- Pandit, B., (2023), “Application of microbial enzymes in food industry: a review”, *Science and culture*.
- Park, S.H., Na, Y., Kim, J., Kang, S.D., Park, K.H., (2018), “Properties and applications of starch modifying enzymes for use in the baking industry”, *Food science and biotechnology*, 27, 299-312.
- Philippis-Wiemann, P., (2018), “Proteases”, *Enzymes in Human and Animal Nutrition, Principles and Perspectives*, 267-277.
- Piironen, V., Salmenkallio-Marttila, M., (2009), “Micronutrients and Phytochemicals in Wheat Grain”, *In Wheat: Chemistry and Technology; American Association of Cereal Chemists: St Paul, MN, USA*, 179–222.
- Resurreccion, A.V.A., Brody, Aaron L., Lord, John B., (2008), “Consumer sensory testing for food product development”, In: *Developing New Food Products for a Changing Marketplace, CRC Press Taylor and Francis Group, FL, USA*, pp. 5–25.
- Ahmad, S., Naz, A., Usman, M., Amjad, A., Pasha, I., Farooq, U., (2022), “Impediment effect of chemical agents (additives) on gluten development in cookie dough”, *Journal of Food Science and Technology*, 59, 1396–1406.
- Sahin, S., Sumnu, G., (2006), “Physical properties of foods”, *New York: Springer*.
- Stauffer, C.E, Kruger, JE, Lineback, D, (1987), “Proteases, peptidases and inhibitors”, *Enzymes and their role in cereal technology*, MN: AACCC, p. 166-9.
- Stemler, C.D., Scherf, K.A., (2023), “Lipases as cake batter improvers compared to a traditional emulsifier”, *LWT*, Volume 174, 114464.
- Türk Gıda Kodeksi, Buğday Unu Tebliği*, Tebliğ No: 2013/9, Tertip: 5, Sayısı: 28606
- Xue, J., Ngadi, M., (2006), “Rheological properties of batter systems formulated using different flour combinations”, *Journal of Food Engineering*, 77, 334–341.
- Zhou, W., Therdthai, N., Hui, Y.H., (2014), “Introduction to baking and bakery products” *Bakery products science and technology*, 1-16.



## THE EFFECT OF PACKAGING METHODS AND STORAGE TEMPERATURES ON THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF MALATYA CHEESE

**Dogan YASAR, Senol KOSE\***

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Van Yuzuncu Yil University, Van, Türkiye

Received /Geliş: 12.02.2024; Accepted/Kabul: 24.09.2024; Published online/Online baskı: 30.09.2024

Yasar, D., Kose, S. (2024). The effect of packaging methods and storage temperatures on the antioxidant and antimicrobial activities of Malatya cheese. *GIDA* (2024) 49 (5) 960-967 doi: 10.15237/gida.GD24026

Yasar, D., Kose, S. (2024). Ambalajlama yöntemleri ve depolama sıcaklıklarının Malatya peynirinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerine etkisi. *GIDA* (2024) 49 (5) 960-967 doi: 10.15237/gida.GD24026

### ABSTRACT

This study analyzed the total phenolic content (TPC), antioxidant, and antimicrobial activity of traditionally produced Malatya cheeses made from cow's milk. Cheeses were ripened either in brine using plastic drums or in dry salted polyethylene bags at 7 and 20°C for 120 days. Results showed that cheeses ripened in polyethylene had higher TPC and antioxidant activity compared to those in plastic drums. The highest TPC and antioxidant activity were found in water-soluble extracts from the dry salted samples ripened at 20°C for 120 days, while the lowest were in cheeses ripened in brine at 7°C for just 2 days. The antimicrobial activity was tested against two bacteria using an agar well diffusion technique, but no antimicrobial effects were observed. Overall, the findings suggest that salting methods, ripening times, and temperatures significantly influence the TPC and antioxidant activity of Malatya cheeses.

**Key words:** Packaging methods, storage temperatures, antioxidant activity, Malatya cheese

### AMBALAJLAMA YÖNTEMLERİ VE DEPOLAMA SICAKLIKLARININ MALATYA PEYNİRİNİN ANTIOKSİDAN VE ANTIMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNE ETKİSİ

#### ÖZ

Bu çalışmada inek sütünden geleneksel yöntemle üretilen Malatya peynirlerinin toplam fenolik madde içeriği (TFM), antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi analiz edilmiştir. Peynir örnekleri plastik bidonlar kullanılarak salamurada ya da kuru tuzlu polietilen poşetlerde 7 ve 20°C'de 120 gün süreyle olgunlaştırılmıştır. Sonuçlar, polietilende olgunlaştırılan peynirlerin plastik bidonlarda olgunlaştırılanlara kıyasla daha yüksek TPC ve antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. En yüksek TFM ve antioksidan aktivite 20 °C'de 120 gün olgunlaştırılan kuru tuzlanmış örneklerde bulunurken, en düşük aktivite ise 7 °C'de 2 gün salamurada olgunlaştırılan peynirlerin suda çözünür ekstraktlarında tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite iki farklı mikroorganizma kullanılarak kuyu difüzyon tekniği ile test edilmiş, ancak herhangi bir etki görülmemiştir. Bu bulgular, tuzlama yöntemlerinin, olgunlaşma sürelerinin ve sıcaklıklarının Malatya peynirlerinin TFM ve antioksidan aktivitesini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Ambalajlama yöntemleri, depolama sıcaklığı, antioksidan aktivite, Malatya peyniri

\* Corresponding author/ Sorumlu yazar

✉: senolkose28@gmail.com

☎: (+90) 0432 2251727

☎: (+90) 0432 225 1730

Dogan Yasar; ORCID ID: 0000-0001-9527-1011

Senol Kose; ORCID ID: 0000-0003-0599-6030

## INTRODUCTION

Malatya cheese is a flat and disc-shaped cheese with a semi-hard texture and a corrugated mass surface due to the special structures of the printing materials (Cakmakci, 2011). This cheese is traditionally produced from sheep's or cow's milk or a mixture of these (Hayaloglu and Karabulut, 2008). Since pasteurization is not applied in traditional production, warm milk is directly fermented and processed into cheese without adding starter culture to milk. However, in recent years, dairy factories operating in Malatya produce Malatya cheese using pasteurized milk and starter culture. Malatya cheese is scalded in water or in whey at 80-90 °C, regardless of whether the milk used in production is pasteurized milk or raw milk. The manufacturing process of Malatya cheese is very similar to Halloumi cheese and cheeses are evaluated in the same category in terms of sensory. However, it is inevitable that there will be some differences both in production and the characteristics of the product (Cakmakci, 2011).

During scalding, some changes occur in the microbiological, biochemical and physical (texture and microstructure) properties of cheese. It is stated that the scalding temperature affects the cheese microflora and decreases in the total number of microorganisms (Ozer et al., 2004).

There are several studies on Malatya cheese so far, and in these studies, the evaluation of Malatya cheese in terms of microbiological quality, chemical properties, mineral content, antioxidant activity, volatile compounds, ripening properties and food safety has been discussed (Hayaloglu and Brenchany, 2007; Hayaloglu et al., 2008; Hayaloglu et al., 2010; Karatekin, 2014; Hayaloglu et al., 2014; Yasar, 2021; Yasar et al., 2021; Kose et al., 2022; Yasar and Kose, 2022). Although there are several studies on some properties of Malatya cheese, there is a study on antioxidant activity (Kose et al., 2022) and no study on antimicrobial properties of Malatya cheese. In this study, the effect of ripening times (2, 30, 60, 90, and, 120 days), ripening temperatures (7 and 20 °C), and salting methods (brining and dry salting) on the antioxidant and antimicrobial activity of

Malatya cheese produced by traditional method were investigated.

## MATERIALS AND METHODS

### Production of Malatya cheeses

According to the cheese making procedure of Hayaloglu et al. (2008), cheese production was carried out in a cheese factory in Malatya. For the production of traditional Malatya cheese, raw cow milk was heated to approximately 32 °C and commercially sold rennet was added and coagulation was carried out in approximately 45 minutes. After coagulation, the clot was cut into 1-2 cm<sup>3</sup> and the serum was separated. After removing at least 1/3 of the whey, approximately 1 kg of curd was taken into special cloths and filtered on its own. Then, tightly connected straining cloths were printed between special printing plates (made by connecting reed rods) and remained in the press for about 2 hours. After pressing, the cheese masses were scalded in their own whey at 85-90 °C for 3-5 minutes. After being pressed again for a very short time after scalding and providing the desired corrugated structure, the molds were brought to room temperature. Some of the obtained cheeses were dry salted and stored in sterile polyethylene bags, and some were stored in 12% (w/v) brine using plastic containers for 120 days (+7 and +20 °C). For each period, the cheeses were stored with approximately 200g of cheese in each package (Figure 1).

### Preparation of water soluble extracts

The extracts was applied by modifying the method given by Kuchroo and Fox (1982). In order to prepare the extracts, 10 g cheese sample was weighed and 20 ml of water was added and homogenized with Ultra Turrax for 1 minute. After the mixture was kept in a water bath at 40°C for 1 hour, it was centrifuged at 10000 rpm for 20 minutes at 4°C. After centrifugation, the upper oil layer was removed with a spatula and the liquid part was filtered using filter paper (Whatman No:1). TPC, antioxidant and antimicrobial activity analyzes were performed by taking the obtained filtrate.

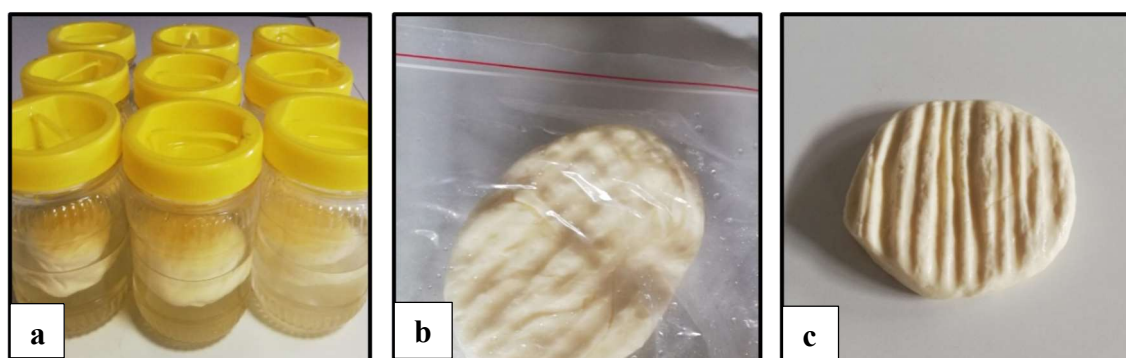


Figure 1. (a) %12 brined Malatya cheeses in plastic containers, (b) Dry salted Malatya cheese in polyethylene bags, (c) Fresh Malatya cheese before packaging

### Total phenolic compounds (TPC)

150  $\mu$ L of sample and 3 mL of sodium carbonate (2%) were placed in the test tubes, and after approximately 2 minutes, 150  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent diluted 1:1 with ultrapure water was added to the tubes and mixed. This mixture was then kept at room temperature in a dark place for 45 minutes and readings were taken on a spectrophotometer (UV Mini-1240, Shimadzu, Japan) at 765 nm. Results were given as gallic acid equivalent (GAE) (Yemis et al., 2008).

### Antioxidant activity

#### DPPH test

100  $\mu$ L of water-soluble extracts obtained from Malatya cheeses were placed in tubes, 2.4 mL of the daily prepared DPPH solution was added and mixed thoroughly. Following mixing, the test tubes were incubated for 30 minutes in a dark environment and readings were made on the spectrophotometer at a wavelength of 520 nm. The results were determined from the inhibition of DPPH (%) =  $[1 - (A/A_0)] \times 100$ , where  $A_0$  was the absorbance of the control and  $A$  is the absorbance of the mixture (Brand-Williams et al., 1995).

#### TEAC test

In the study, firstly,  $ABTS^{\bullet+}$  radical was formed by reacting 7 mM  $ABTS^{\bullet+}$  with 2.45 mM potassium persulfate for 12-16 hours in the dark at room temperature. The formed  $ABTS^{\bullet+}$  radical was diluted with ethanol to give an absorbance of  $0.700 \pm 0.05$  at 734 nm, and 2.97 mL of this solution was taken and 30  $\mu$ L of the

extract obtained from the samples was added. After the mixture was kept at room temperature for 6 minutes, the absorbance was measured at 734 nm and the results were expressed as mmol TE/g (Kırca and Ozkan, 2007).

### Antimicrobial activity

Antimicrobial activity of Malatya cheeses were determined using two different microorganisms (*Escherichia coli* ATCC 11303 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) with an agar well diffusion technique (National Committee for Clinical Laboratory Standard [NCCLS], 1999).

Firstly, a loopful of bacterial colonies from 18-24 hour fresh bacterial cultures were suspended in sterile FTS and the density of the bacterial suspensions was adjusted according to the 0.5 McFarland standard. 100  $\mu$ L of the adjusted bacterial suspensions was taken and spread into Petri dishes containing Müller-Hinton Agar (MHA, Oxoid) using a drigalski loop. 100  $\mu$ L of water-soluble cheese extracts were added to the media with 5 mm diameter wells at certain points. The petri dishes prepared in this way were incubated at 37°C for 24 hours and the inhibition zones formed on the medium were measured with the help of a digital caliper and evaluated in mm. Studies were conducted in 3 parallels and standard antibiotic discs (30  $\mu$ g tetracycline and 10  $\mu$ g ampicillin) were used for comparison as positive controls.

**Statistical analysis**

SAS version 9.4 statistical program was used in the analysis of the data obtained from the study. General linear model (GLM) analysis was performed to define the differences between the means of the groups, and Duncan's multiple comparison test was used to define the differences between the groups. In addition, the t test was used to compare two independent groups.

**RESULTS AND DISCUSSIONS**

While the TPC values of cheese samples stored in plastic packaging at 7°C ranged between 254.88 mg GAE/kg and 646.23 mg GAE/kg, the TPC values of the samples stored at 20°C were found to vary between 265.72 mg GAE/kg and 661.78 mg GAE/kg. The TPC values of cheese samples ripened in polyethylene packaging ranged from 424.05 mg GAE/kg to 695.11 mg GAE/kg at 7°C, and the TPC values of the samples ripened at 20°C ranged between 473.36 mg GAE/kg and 755.11 mg GAE/kg.

As seen in Table 1, it is thought that the compounds formed as a result of glycolysis, lipolysis and proteolysis reactions due to ripening during the preservation of cheeses stored at different temperatures and packages cause an increase in TPC concentration during storage. A similar situation has been reported by Rashidinejad et al. (2015) and Kose and Ocak (2020). Also, the TPC of the cheeses stored in brine in plastic packaging at different temperatures were lower than the TPC of the cheeses stored in dry salted polyethylene packaging. Hala et al. (2010) reported that salting prevents the phenolic compounds from reacting with the Folin-Ciocalteu reagent, making it difficult to determine all of the phenolic compounds and causing a low result. In addition, salting activates the dissolution of Ca<sup>2+</sup>, resulting in an increase in surface charge, volume, and hydration in casein micelles. This situation causes some phenolic compounds to interact with water through hydrogen bonds and causes the values of phenolic compounds to decrease. (Hala et al., 2010).

Table 1. Changes in TPC values during ripening of Malatya cheese samples stored using different packaging materials and different temperatures (mg GAE/kg)

Packaging type	Storage		Storage time (Days)				
	Temperature (°C)		2	30	60	90	120
Plastic	7		254.88±4.68 <sup>D</sup>	442.89±5.56 <sup>C</sup>	466.22±2.22 <sup>CB</sup>	482.99±7.78 <sup>Bz</sup>	646.23±15.5 <sup>A</sup>
	20		265.72±0.50 <sup>E</sup>	457.34±2.23 <sup>D</sup>	472.89±2.22 <sup>C</sup>	578.45±5.56 <sup>Bβ</sup>	661.78±2.22 <sup>A</sup>
Polyethylene	7		424.05±0.05 <sup>Dz</sup>	614±5.56 <sup>Cz</sup>	646.23±4.45 <sup>Bz</sup>	675.11±8.89 <sup>A</sup>	695.11±8.89 <sup>Az</sup>
	20		437.36±2.20 <sup>Dβ</sup>	672.89±4.45 <sup>Cβ</sup>	684±2.22 <sup>Cβ</sup>	712.84±6.72 <sup>B</sup>	755.11±6.67 <sup>Aβ</sup>

<sup>z, β</sup> The difference between the samples of the same package in the same period ( $P < 0.05$ ), <sup>A,B,C,D,E</sup> letters indicate the difference between periods ( $P < 0.05$ ).

Canozer ve Kose (2022) determined that the TPC ratio of traditionally produced Orgu cheese samples ranged from 632.07 mg GAE/kg to 1091.36 mg GAE/kg, and the TPC rate of the industrially produced Orgu cheese samples ranged between 288.86 mg GAE/kg and 930.29 mg GAE/kg. Kara and Kose (2020) determined that the TPC ratio of Herby cheese samples ripened by the brine method ranged from 345.04 mg GAE/kg to 1117.26 mg GAE/kg, and the TPC ratio of Herby cheese samples ripened by the pressing method ranged from 639.11 mg

GAE/kg to 1030.96 mg GAE/kg. When the data obtained in the study were compared with the literature, it was determined that some values were low and some values were similar. It is thought that this difference arises from the storage conditions and maturity level of the cheeses.

The DPPH inhibition rate of the Malatya cheeses stored in plastic packaging at 7°C ranged from 5.44% to 11.01%, and the DPPH inhibition rate of the samples stored at 20°C ranged between

5.71% and 12.19%. Also, the DPPH inhibition rate of the cheese samples stored in polyethylene packaging ranged from 6.95% to 12.61% at 7°C, and the DPPH inhibition rate of the samples stored at 20°C ranged between 8.02% and 13.92%. Although free radical scavenging activity was present in all samples throughout the ripening period, it was relatively low and reached maximum values of up to 13.92%. The weak

radical scavenging capacity may be attributed to the inability of the present peptides to exhibit this activity. In this regard, the donation of a proton or electron is required for the scavenging of free radicals, and if the structure of the amino acids present in the peptide is not adequate, the clearance of radicals will decrease (Ramos et al., 2022).

Table 2. Changes in DPPH inhibition values during maturation of Malatya cheese samples stored using different packaging materials and different temperatures (%)

Packaging type	Storage Temperature (°C)	Storage time (Days)				
		2	30	60	90	120
Plastic	7	5.44±0.00 <sup>Ez</sup>	7.58±0.20 <sup>D</sup>	8.44±0.19 <sup>C</sup>	9.35±0.20 <sup>B</sup>	11.01±0.35 <sup>A</sup>
	20	5.71±0.01 <sup>Dβ</sup>	6.59±0.63 <sup>D</sup>	8.69±0.14 <sup>C</sup>	10.39±0.14 <sup>B</sup>	12.19±0.56 <sup>A</sup>
Polyethylene	7	6.95±0.05 <sup>Ez</sup>	7.45±0.07 <sup>Dz</sup>	10.95±0.13 <sup>C</sup>	11.79±0.19 <sup>B</sup>	12.61±0.14 <sup>A</sup>
	20	8.02±0.02 <sup>Dβ</sup>	8.75±0.20 <sup>Dβ</sup>	11.41±0.07 <sup>C</sup>	12.89±0.42 <sup>B</sup>	13.92±0.35 <sup>A</sup>

<sup>z, β</sup> The difference between the samples of the same package in the same period ( $P < 0.05$ ),

<sup>A, B, C, D, E</sup> letters indicate the difference between periods ( $P < 0.05$ ).

Canozler (2020) reported that the DPPH inhibition rate of the traditionally produced Orgu cheese samples ranged from 2.19% to 6.90%, and the DPPH inhibition rate of the industrially Orgu cheese samples ranged from 2.65% to 9.56%. Kose and Ocak (2020) reported that the DPPH inhibition rate of Herby cheeses ranged from 2.87% to 9.84%, and the DPPH inhibition rate of Herby cheese samples matured in vacuum packaging ranged from 2.87% to 11.76%. Kara and Kose (2020) reported that the DPPH inhibition rate of Herby cheese samples ripened in brine ranged from 3.60% to 9.59%, and the DPPH inhibition rate of Herby cheese samples

matured by pressing method ranged from 4.31% to 13.05%. Erkaya and Sengül (2015) determined that the DPPH inhibition rate of the water-soluble white cheese extracts varied between 5.10% and 10.38%. When the data obtained in the study was compared with the literature, it was determined that some values were similar, some were low, and some were high. It is thought that this is due to the fact that the antioxidant potential of cheeses varies depending on the type of milk, starter cultures (Stobiecka et al., 2022), storage time, treatment, and packaging type (Kose and Ocak, 2020).

Table 3. Changes in TEAC values (mmol TE/g) during ripening of Malatya cheese samples stored using different packaging materials and different temperatures.

Packaging type	Storage Temperature (°C)	Storage time (Days)				
		2	30	60	90	120
Plastic	7	1.25±0.01 <sup>Ez</sup>	1.72±0.08 <sup>D</sup>	2.46±0.14 <sup>C</sup>	3.11±0.03 <sup>B</sup>	4.09±0.03 <sup>Az</sup>
	20	1.35±0.01 <sup>Eβ</sup>	2.36±0.03 <sup>D</sup>	3.07±0.05 <sup>C</sup>	3.25±0.04 <sup>B</sup>	4.48±0.05 <sup>Aβ</sup>
Polyethylene	7	1.51±0.01 <sup>D</sup>	2.53±0.35 <sup>C</sup>	3.32±0.27 <sup>B</sup>	3.37±0.04 <sup>Bz</sup>	4.62±0.08 <sup>Az</sup>
	20	1.63±0.05 <sup>E</sup>	2.75±0.09 <sup>D</sup>	3.39±0.04 <sup>C</sup>	3.64±0.04 <sup>Bβ</sup>	5.24±0.05 <sup>Aβ</sup>

<sup>z, β</sup> The difference between the samples of the same packaging in the same period ( $P < 0.05$ ),

<sup>A, B, C, D, E</sup> letters indicate the difference between periods ( $P < 0.05$ ).

The TEAC ratio of Malatya cheeses stored in plastic packaging at 7°C ranged between 1.25 and 4.09 mmol TE/g, and the TEAC ratio of the samples stored at 20°C ranged between 1.35 and 4.48 mmol TE/g. The TEAC ratio of the Malatya cheeses stored in polyethylene packaging at 7°C ranged from 1.51 to 4.62 mmol TE/g, and the TEAC ratio of the samples stored at 20°C ranged between 1.63 and 5.24 mmol TE/g.

According to the obtained data, it was determined that TEAC values increased with time. It is thought that the increase in antioxidant activity in cheese is due to the increase in water-soluble peptide formation due to ripening. Similarly, Gupta et al. (2009) detected that TEAC values increased until the 4th month of storage. In addition, TEAC values of cheese samples ripened in polyethylene packaging were determined to be higher than those ripened in plastic packaging.

The zone diameters of Tetracycline (30µg) and Ampicillin (10µg) against *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were found as 38 and 29 mm, respectively. The Ampicillin (10 µg) and Tetracycline (30 µg) produced 21 and 19 mm zone diameters against *Escherichia coli* ATCC 11303, respectively. The water-soluble extracts of traditionally produced Malatya cheeses did not show any antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 29213 and *E. coli* ATCC 11303.

### CONCLUSIONS

The TPC and antioxidant activity of water-soluble extracts of traditionally produced Malatya cheese from raw cow's milk varied depending on the salting methods, ripening temperatures and times. Additionally, it was determined that the extracts did not show any antimicrobial activity against the tested bacteria.

TPC and antioxidant activity of Malatya cheeses stored in plastic packaging in brine were lower than the antioxidant activity of Malatya cheeses stored in dry salted polyethylene packaging. Also, TPC and antioxidant activity of Malatya cheeses ripened at 20°C were higher than those ripened at 7°C. Based on these results, dry salting of cheeses and ripened them in polyethylene packaging at 20

°C for 120 days can be recommended for Malatya cheese with high antioxidant activity.

These findings shed light on the significant impact of processing and storage conditions on the bioactive properties of Malatya cheese. Further research could investigate the underlying mechanisms governing the observed variations and explore additional factors influencing the antioxidant and antimicrobial characteristics of this traditional cheese variety. Such insights can inform strategies to optimize the production and quality of Malatya cheese, improve its nutritional and functional properties, and meet consumer preferences and market demands.

**ACKNOWLEDGMENTS:** This study was financially supported by Van Yüzüncü Yıl University Scientific Research Projects Coordination Unit, Project No: FYL-2020-8851.

### REFERENCES

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* 28(1): 25–30.
- Canozer, C. (2020). Comparison of some characteristic properties of Diyarbakır Orgu cheese produced by traditional and industrial method. MSc dissertation, Van Yuzuncu Yil University Graduate School of Natural and Applied Sciences, Van, Turkey.
- Canozer, C., Kose, S. (2022). Comparison of some characteristic properties of Diyarbakır Orgu cheese produced by traditional and industrial method. *Food Science and Technology* 42: e16921.
- Çakmakçı, S. (2011). *Türkiye peynirleri*. In: Hayaloglu AA, Ozer B (ed.), *Peynir Biliminin Temelleri*, Sidas Medya, İzmir, Türkiye, 585-614.
- Erkaya, T., Sengül, M. (2015). Bioactivity of water soluble extracts and some characteristics of white cheese during the ripening period as effected by packaging type and probiotic adjunct cultures. *Journal of Dairy Research* 82: 47–55.
- Gupta, A., Mann, B., Kumar, R., Sangwan, R.B. (2009). Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. *International Journal of Dairy Technology* 62(3): 339–347.



- Hala, M.F.E., Ebtisam, I.G., Sana, M.A.B., Gad, A.S., Marwa, M.E.S. (2010). Manufacture of low fat UF-soft cheese supplemented with rosemary extract (as natural antioxidant). *The Journal of American Science* 6(10): 570–579.
- Hayaloglu, A.A., Brechany, E.Y. (2007). Influence of milk pasteurization and scalding temperature on the volatile compounds of Malatya, a farmhouse Halloumi-type cheese. *Lait* 87: 39–57. <https://doi.org/10.1051/lait:2006025>
- Hayaloğlu, A.A., Karabulut, İ. (2008). Haşlama Sıcaklığı, pH, kalsiyum ve tuz konsantrasyonunun Malatya peynirinin yapısal, fonksiyonel ve olgunlaşma özellikleri üzerine etkisi. Proje No: 107 O 318, TÜBİTAK, Ankara.
- Hayaloglu, A.A., Ozer, B.H., Fox, P.F. (2008). Cheeses of Turkey: 2.Varieties ripened under the brine. *Dairy Science and Technology* 88: 225–244. <https://doi.org/10.1051/dst:2007014>
- Hayaloglu, A.A., Deegan, K.C., Mcsweeney P.L.H. (2010). Effect of milk pasteurization and curd scalding temperature on proteolysis in Malatya, a Halloumi-type cheese. *Dairy Science and Technology* 90: 99–109. <https://doi.org/10.1051/dst/2009052>
- Hayaloglu, A.A., Karatekin, B., Gurkan, H. (2014). Thermal stability of chymosin or microbial coagulant in the manufacture of Malatya, a Halloumi type cheese: Proteolysis, microstructure, and functional properties. *International Dairy Journal* 38: 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.idair.2014.04.001>
- Karatekin, B. (2014). Effects of some manufacturing parameters on the functional and ripening properties of Malatya cheese. MSc thesis, Inonu University Institute of Science, Malatya, Turkey.
- Kara, S., Kose, S. (2020). Determination of some quality parameters and bioactivity of Herby cheese produced by traditional method. *GIDA-The Journal of Food* 45(5): 942-953.
- Kırca, A., Ozkan, M. (2007). *Değişik amaçlı bazı test ve analiz yöntemleri*. In: Cemeroglu B (ed.), Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, Türkiye, 535.
- Kose, S., Ocak, E. (2020). Determination of antioxidant and antimicrobial activity of Herby cheese. *Journal of Food Processing and Preservation* 44(11): e14841.
- Kose, S, Ceylan, M.M., Altun, I., Erim Kose, Y. (2022). Determination of some basic properties of traditional malatya cheese. *Food Science and Technology* 42: e03921.
- Kuchroo, C.N., Fox, P.F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37: 331-335.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard (1999). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 9th International Supplement. M100-S9, Wayne, PA.
- Özer, H.B., Uraz, G., Beyzi-Yilmaz, E., Atasoy, A.F. (2004). Effect of brine concentration and scalding on survival of some pathogens in Urfa cheese: a traditional white-brined Turkish cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 39 (7): 727-735.
- Ramos, L. Á., Baez, D. A., Ortiz, G. D., Ruiz, J. C. R., & López, V. M. T. (2022). Antioxidant and antihypertensive activity of Gouda cheese at different stages of ripening. *Food Chemistry: X*, 14, 100284.
- Rashidinejad, A., Birch, E.J., Sun-Waterhouse, D., Everett, D.W. (2015). Total phenolic content and antioxidant properties of hard low-fat cheese fortified with catechin as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *LWT* 62(1): 393–399.
- Stobiecka, M., Król, J., Brodziak, A. (2022). Antioxidant Activity of Milk and Dairy Products. *Animals*. 2022; 12(3):245. <https://doi.org/10.3390/ani12030245>
- Yasar, D. (2021). Effect of packaging type, storage time and temperature on some characteristics of Malatya cheese produced by traditional method. Van, Turkey, Van Yuzuncu Yil University Institute of Science, diss.
- Yasar, D., Erim Kose, Y., Kose, S. (2021). Kinetic modeling of macroelement concentration of Malatya cheese produced by traditional method. *Journal of Food Processing and Preservation* 45: e16021. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16021>

Yasar, D., Kose, S. (2022). Geleneksel yöntemle üretilen Malatya peynirinin bazı kimyasal ve biyokimyasal özellikleri üzerine ambalaj çeşidi ve farklı depolama koşullarının etkisi. *JIST* 12(4): 2237-2248.

Yemis, O., Bakkalbasi, E., Artık, N. (2008). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed

extracts obtained from different varieties grown in Turkey. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 154–159.

## AYDIN İLİNDE SATILAN ÇÖREK OTLU ÇÖKELEK PEYNİRLERİNİN GENEL BİLEŞİMİ, YAĞ ASİDİ VE UÇUCU BİLEŞEN KOMPOZİSYONU

**Ecem AKAN\*, Filiz YILDIZ AKGÜL, Ayşe Demet KARAMAN**

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü, Koçarlı, Aydın, Türkiye

Geliş/Received: 08.05.2024; Kabul /Accepted: 17.09.2024; Online baskı /Published online: 04.10.2024

Akan, E., Yıldız Akgül, F., Karaman, A. D. (2024). Aydın ilinde satılan çörek otlı Çökelek peynirlerinin genel bileşimi, yağ asidi ve uçucu bileşen kompozisyonu. GIDA (2024) 49 (5) 968-980 doi: 10.15237/gida.GD24052

*Akan, E., Yıldız Akgül, F., Karaman, A. D. (2024). General composition, fatty acid and volatile component composition of Çökelek cheese with black cumin sold in Aydın province. GIDA (2024) 49 (5) 968-980 doi: 10.15237/gida.GD24052*

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı Aydın ilinde geleneksel olarak üretimi yapılan ve fazlaca tüketilen çörek otlı Çökelek peynirinin fizikokimyasal özellikleri, uçucu bileşenleri ve yağ asitleri profilini ortaya koymaktır. Bu amaçla Aydın ilinde bulunan pazarlar ve şarküterilerden 40 peynir örneği toplanmıştır. Fizikokimyasal parametrelerden kuru madde, yağ, protein, kül, tuz, renk, pH ve titrasyon asitliği değerleri belirlenmiştir. Peynirlerin uçucu bileşenleri Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), yağ asitleri ise Gaz kromatografisi (GC) yöntemiyle saptanmıştır. Çökelek peynirlerinde 56 farklı uçucu bileşen tespit edilmiştir. Yağ asitleri arasında doymuş yağ asitlerinden palmitik asit, doymamış yağ asitlerinden oleik asit en fazla miktarda saptanmıştır. Bu çalışma sonuçları, Aydın ilinde üretilen çörek otlı Çökelek peynirinin Coğrafi İşaret tescilinin alınması için gerekli literatüre katkı sağlayacaktır. Çörek otlı Çökelek peyniri için Coğrafi İşaret tescili üreticinin korunması, peynirin tanınırlığının ve pazarlama imkanının artmasına sebep olarak üretildiği bölgeye ve ülkemize önemli ekonomik kazanç sağlayabilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Çökelek peyniri, çörek otu, Aydın, uçucu bileşen, yağ asitleri

### GENERAL COMPOSITION, FATTY ACID AND VOLATILE COMPONENT COMPOSITION OF ÇÖKELEK CHEESE WITH BLACK CUMIN SOLD IN AYDIN PROVINCE

#### ABSTRACT

This study aims to reveal the physicochemical properties, volatile components, and fatty acid profile of Çökelek cheese with black cumin. This cheese is traditionally produced and widely consumed in Aydın province. For this purpose, 40 cheese samples were collected from markets and delicatessens in Aydın. Dry matter, fat, protein, ash, salt, color, pH and titratable acidity values were determined. Volatile components of cheeses were determined by Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and fatty acids were determined by Gas chromatography (GC). A total of 56 different volatile compounds were detected in Çökelek cheeses. Palmitic acid from saturated fatty acids, and oleic acid from unsaturated fatty acids, were detected in the highest amount. These findings will contribute to

\*Sorumlu yazar/ Corresponding author

✉: ecem.akan@adu.edu.tr

☎: (+90) 256 220 6547

Ecem Akan; ORCID no: 0000-0001-6479-7336

Filiz Yıldız Akgül; ORCID no: 0000-0001-7894-6531

Ayşe Demet Karaman; ORCID no: 0000-0001-9913-9763

the literature for obtaining Geographical Indication registration for Çökelek cheese with black cumin in Aydın. This could bring significant economic benefits by protecting local producers and boosting the cheese's recognition and marketing opportunities.

**Keywords:** Çökelek cheese, black cumin, Aydın, volatile component, fatty acids

### GİRİŞ

Temel gıdalarımızdan biri olan peynir, süt ürünleri içerisinde uzun raf ömrü, yüksek kaliteli protein düzeyi, kalsiyum, vitamin ve minerallerce zengin olması sebebiyle önemli yer tutmaktadır. Peynir, süt ürünleri içerisinde en fazla çeşitliliğe sahip olan üründür (Çakmakçı, 2011). Günümüzde farklı üretim ve olgunlaştırma yöntemleriyle çok farklı karakteristik özelliklere sahip peynirlerin üretimi gerçekleştirilmektedir (Karaalioğlu vd., 2021). Dünyada yaklaşık 4000 peynir çeşidinin olduğu bildirilmekle birlikte (Bialek vd., 2020) ülkemiz peynir çeşitliliği açısından özellikle geleneksel peynirler açısından oldukça zengindir. Türkiye’de Beyaz peynir, Tulum peyniri, Kaşar peyniri, Lor ve Çökelek ön planda olmak üzere toplamda 150’den fazla peynir çeşidinin bulunduğu belirtilmektedir (Çakmakçı ve Salık, 2021). Beyaz peynir ve Tulum peynirinden sonra en çok tüketilen peynirler Lor ve Çökelek peyniridir (Berkay Karaca vd., 2020).

Çökelek ve Lor peynirleri genellikle aile işletmelerinde geleneksel yöntemlerle üretilmekte ve Türkiye'nin kırsal kesimlerinde daha yüksek yoğunlukta tüketilmektedir (Kamber, 2008). Çökelek peyniri, az yağlı ve düşük kalorili iyi bir protein ve kalsiyum kaynağı olarak tüketilen peynirlerdendir (Önganer ve Kırbağ, 2009; Kavaz vd., 2012). Lor peynirinin aksine Çökelek peyniri peynir altı suyu proteinleri yanında kazeini de içermektedir. Çökelek peyniri ülkemizin farklı bölgelerinde yaygın şekilde üretilmekte ve Ekşimik, Keş, Akçakatik, Kesmik, Urda, Minci gibi farklı isimlerle adlandırılmaktadır (Dervisoglu vd., 2009; Kırdar, 2003). Çökelek peyniri süt, yoğurt, peynir altı suyu (Tatlı, 2009) ayran ve tereyağından üretilmektedir. Geleneksel olarak yayık tereyağı üretiminden ve yoğurdun sulandırılarak yayıklanması işlemi sonrasında elde edilen yayık altına ısı işlem uygulanarak üretilmektedir (Karabulut vd., 2007; Şanlıdere Aloğlu vd., 2012). Ege Bölgesinde Çökelek peyniri geleneksel olarak ayranın 5 dakika kaynatılması, soğutulması, süzülmesi, %4-5 oranında tuz ilavesi

ve tekrar 24 saat kadar süzülmesi aşamaları sonrası elde edilmektedir (Karagozlu ve Tonguç, 2020). Aydın ilinde de Çökelek peyniri üreticilerinden alınan bilgilere göre geleneksel yöntemle ayranın yayıklanması sonucu yayık altına ısı işlem uygulanması yoluyla üretilmektedir. Isıl işlem sonrası elde edilen pıhtı fazla suyun uzaklaştırılması amacıyla taş baskılar yardımıyla süzülmekte ve süzülen pıhtı tuzlanarak küplere, plastik bidonlara veya çuvallara doldurularak yaklaşık 1 ay olgunlaştırıldıktan sonra çörek otu ilavesi yapılmakta ve satışa sunulmaktadır. Bazı üreticiler ise artan talepten dolayı pıhtıyı süzdükten sonra tuz ve çörek otu (*Nigella sativa* L.) ilavesi yapıp Çökeleği hemen satışa sunduklarını da belirtmektedir. Bölgede çörek otu terimi yerine karacaotu terimi de kullanılabilen ve peynir karacaotlu Çökelek peyniri olarak da anılmaktadır. Bu çalışmada Aydın’da üretilen çörek otlı Çökelek peynirlerinin genel bileşiminin, uçucu maddelerinin ve yağ asitleri profilinin ortaya konması amaçlanmıştır.

### MATERYAL ve YÖNTEM

#### Materyal

Aydın ili merkez Efeler ilçesinde yer alan pazar ve şarküterilerden 40 adet çörek otlı Çökelek peyniri toplanmıştır. Toplanan peynirlerin aynı gün içerisinde fizikokimyasal analizleri yapılmıştır. Uçucu bileşen ve yağ asitleri analizi için örnekler ekstrakte edilmiş ve analiz yapılmaya kadar -18 °C’de muhafaza edilmiştir.

#### Yöntem

##### *Fizikokimyasal analizler*

Peynirlerde pH tayini dijital pH metre (Thermo Scientific Orion Star 4, Waltham, Massachusetts, ABD) kullanılarak Polychroniadou vd. (1999) önerdiği yöntemle belirlenmiştir. Asitlik tayini alkali titrasyon yöntemi ile, toplam kuru madde gravimetrik yöntemle, yağ tayini Gerber yöntemi ile, protein tayini mikro Kjeldahl yöntemi ile AOAC (2003)’te ayrıntısı verilen yöntemler kullanılarak saptanmıştır. Tuz tayini ise Mohr titrasyon yöntemine göre Bradley vd. (1993)’te

belirtildiği şekilde yapılmıştır. Çökelek peynirlerinin renk parametreleri olan *L*, *a* ve *b* değerleri renk analiz cihazında (Hunter Lab, Color Flex EZ serisi S/N CFEZ 1209, USA) belirlenmiştir.

#### *Uçucu bileşenlerin tespiti*

Çökelek peynirlerinin uçucu bileşenlerinin ekstraksiyonunda, Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME) yöntemi kullanılmıştır (Stashenko ve Martinez, 2007). Örneklerden 10 gram alınıp 40 mL'lik amber viallere tartılıp üzerine 1 gram NaCl (örnek miktarının %10'u olacak miktarda) ve 10 µL internal standard (81 ppm, 2 metil 3-heptanon) ilave edilmiştir. Gaz kromatografisi sistemine enjeksiyonundan önce vialler SPME ekstraksiyon düzeneğinde 40°C de 30 dakika uçucu bileşenlerin dengelenmesi için bekletilmiş ve daha sonra 50/30 µm Divinylbenzene/ Carboxen/ Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS, Agilent, USA) fiber üzerine uçucu bileşenlerin adsorpsiyonu için fiber ile 30 dakika bekletilerek GC-MS'e enjeksiyon yapılmıştır. Uçucu bileşenlerin ayırımında, kütle spektrometresinde tanımlanması için, üzerinde kütle spektrometresi (mass spectrometer) ve alev iyonlaşma dedektörü (flame ionization dedector, FID) bulunan Agilent marka GC 7890A (Agilent, USA) gaz kromatografisi kullanılmıştır. SPME yöntemi ile fiber üzerine adsorbe olan uçucu bileşenlerin fiberden enjeksiyon bloğuna desorpsiyonu, manuel olarak splitless modunda yapılmış 250 °C' de fiber 10 dk desorpsiyon için tutulmuştur. DB Wax kolonda (122-7032, Agilent Technologies, ABD; 30 m×0.25 mm i.d; 0.25 µm film kalınlığı) ayrılan uçucu bileşenler, GC5975 C MSD kütle spektrometresinde 30-300 m/z aralığında taranarak belirlenmiştir. Gaz kromatografisinde kolon sıcaklık programı; 40°C'de 5 dakika bekletme, 10°C'lik artışla 100°C'ye ısıtma, 20°C'lik artışla 200°C'ye ısıtma ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekletme şeklinde uygulanmıştır. Uçucu bileşenlerin tanımlanmasında NIST/Flavournet kütüphanelerinde (2009) tarama yapılmıştır. Uçucu bileşenlerin miktarları, örneklerin ekstraksiyonu sırasında kullanılan iç (internal) standart alanları ve uçucu bileşenlerin gaz kromatografisinde elde edilen alanları kullanılarak hesaplanmıştır.

#### *Yağ asitleri profilinin belirlenmesi*

Yağ asitleri (FA) profili, Bannon vd. (1982) yöntemine göre FA metil esterleri (FAME) oluşturularak belirlenmiştir. Örnekler (0.3-0.5 g), 115 °C'de 7 dakika boyunca 1.5 mL 0.5 N metanollü NaOH ile karıştırılmıştır. Soğutulduktan sonra 2 mL boron triflorür ilave edilmiş ve aynı sıcaklıkta 5 dakika daha ısıtılmıştır. Daha sonra test tüpleri soğutulmuş ve 2 mL izo-oktan ve 3 mL doymuş NaCl çözeltisi ilave edilerek 1 dakika süreyle karıştırılmıştır. Homojen karışım 1000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiş ve süpernant GC analizi için amber şişeye aktarılmıştır. FAME ekstraktları GC analizine kadar -20 °C'de dondurucuda saklanmıştır. FAME, alev iyonizasyon dedektörü ile donatılmış ve bir kapiler HP-FFAP kolonu (JJ&W 19091F-433, Agilent Technologies; 30 m × 0.25 mm i.d; 0.25 µm film kalınlığı) ile donatılmış bir GC (Agilent 7697A, Agilent Technologies, CA, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak azot kullanılmış ve akış hızı 3 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Başlangıç fırın sıcaklığı 100 °C'ye ayarlanmış ve dakikada 10 °C artarak 240 °C'ye çıkacak şekilde programlanmıştır. Numune hacmi 2 µL, giriş sıcaklığı 225 °C ve split oranı 100:1 olarak ayarlanmıştır. Yağ asitlerinin tanımlanması, standart FAME karışımının (Supelco FAME karışımı, Sigma-Aldrich, Almanya) alıkonma süreleri baz alınarak hesaplanmıştır.

## **SONUÇLAR ve TARTIŞMA**

### **Fizikokimyasal özellikler**

Çörek otlu Çökelek peynirlerinin kuru madde, protein, yağ, kül, tuz, pH ve laktik asit düzeyleri belirlenmiş ve sonuçlar ortalama olarak Çizelge 1'de verilmiştir. Çökelek peynirlerinin ortalama kuru madde, protein, yağ, kül, tuz değerleri sırasıyla %45.84, %22.64, %5.50 %5.52, %4.72 olarak saptanmıştır. Kavaz vd. (2012) sütün ürettikleri Çökelek peynirinin kuru madde, yağ, kül ve protein değerlerini sırasıyla %47.85, %19.59, %4.78 ve %2.61 olarak saptamıştır. Şanlı ve Anlı (2020) yoğurt ve kefirin yayıkaltı suyundan ürettikleri Çökelek peynirinde kuru madde değerinin %21.47-24.54, yağ içeriklerinin %1.5-2, kül değerlerinin %1.41-1.59, protein düzeylerinin %19.55-21.22 aralığında değiştiğini bildirmiştir. Celem vd. (2018) Malatya marketlerinde taze

olarak ve deride olgunlaştırılmış şekilde satılan Çökelek peynirlerinin kuru madde değerlerinin sırasıyla ortalama %23.9 ve % 34.1 olduğunu bildirmiştir. Çardak (2012) Aydın yöresinde üretilmiş Çökelek peynirlerinin kuru madde, yağ, protein, kül ve tuz değerlerinin ortalama sırasıyla %60.83, %15.45, %25.95, %4.04 ve %2.90 olarak saptamıştır. Literatürde farklı şekillerde üretilen Çökelek peynirlerinin kuru madde değerlerinin oldukça farklı düzeylerde olduğu görülmüştür. Araştırma sonuçlarımız Kavaz vd. (2012) sonuçlarıyla paralellik göstermiştir.

Çalışmamızda Çökelek peynirlerinin pH değerleri 4.38-6.32, titrasyon asitliği değerleri ise %0.18-1.17 aralığında değişmiştir. Kavaz vd. (2012) Çökelek peynirinin pH değerini 4.51, Çardak (2012) pH ve titrasyon asitliği değerlerini sırasıyla, 2.96-5.35 ve %0.25-0.79 laktik asit aralığında, Celem vd. (2018) Malatya'da satılan Çökeleklere pH ve titrasyon asitliği değerlerinin sırasıyla 3.8-4.6, %0.4-0.9 aralığında değiştiğini bildirmiştir. Şanlıdere Aloglu vd. (2012) bir Çökelek türü olan Minci peynirinde pH değerinin 4.25-7.25 aralığında değiştiğini belirtmiştir. Peynirlerde asitlik düzeyi hammaddenin bileşimi, kullanılan starter kültür, üretim yöntemi, depolama koşulları gibi pek çok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (Fox vd., 1993).

Renk, lezzet ve doğallık gibi gıda kalitesine katkıda bulunan bir parametredir ve tüketici seçimlerini etkilemektedir (Tarakci vd., 2011). Renk parametreleri olan  $L$ ,  $a$  ve  $b$  değerleri üç boyutlu bir koordinat sisteminde belirtilmekte olup dikey eksen  $L$  değeri parlaklıktan (100) karanlığa (0),  $+a$  kırmızıdan yeşile ( $-a$ ),  $+b$  ise sarıdan ( $+b$ ) maviye ( $-b$ ) geçişi belirtmektedir (Akan vd., 2021). Çalışmamızda çörek otlı Çökelek peynirlerinin renk parametresi olan  $L$  değeri 42.65-48.69,  $a$  değeri -0.68-1.06 ve  $b$  değeri 8-12.54 aralığında değişmiştir.  $L$  değerlerinin ambalaj materyali, peynire ilave edilen bitki çeşidi ve olgunlaşma süresinden etkilendiği belirtilmektedir (Akan vd., 2021). Ayrıca peynirin olgunlaşması sürecinde de lipolizin etkisiyle  $L$  değerlerinin düştüğü bildirilmektedir (Sulejmani ve Hayaloglu, 2016; Khosrowshahi vd., 2006). Celem vd. (2018) Malatya bölgesinden temin

ettikleri taze ve deri tulumda olgunlaştırılan Çökelek peynirlerinde ortalama  $L$  değerinin 89.73-93.93,  $a$  değerinin 2.67-3.09,  $b$  değerinin ise 5.19-7.89 aralığında olduğunu bildirmiştir. Şanlıdere Aloglu vd. (2012) bir Çökelek peynir türü olan Minci peynirinin  $L$ ,  $a$  ve  $b$  değerlerini sırasıyla 92.92, 1.2 ve 11.25 olarak belirlemiş ve üretim sırasında uygulanan ısıl işlemlere bağlı olarak Minci peynirlerinin renginin beyazdan sarıya değiştiğini bildirmiştir. Çalışmamızda Çökelek peynirlerinin çörek otu içermesi sebebiyle  $L$  değerlerinin bazı araştırma sonuçlarına göre daha düşük olduğu söylenebilir. Bunun yanında bu farklılıkların üretim yöntemlerinden ve özellikle protein ve yağ içeriklerindeki kompozisyon farklılıklarından kaynaklanmış olabileceği bildirilmektedir (Celem vd., 2018). Akan vd. (2021) çörek otu ilaveli lor peynirlerinin  $L$  değerlerinin 42.69-45.44,  $a$  değerlerinin 0.14-0.41,  $b$  değerlerinin ise 8.62-9.93 aralığında değiştiğini bildirmiştir. Bu çalışmada saptanan  $L$  ve  $b$  değerleri çalışma sonuçlarımızla paralellik göstermiştir.

### Uçucu bileşenler

Çörek otlı Çökelek peynirlerinin uçucu bileşenleri GC-MS ile saptanmış ve sonuçlar mg/kg düzeyinde verilmiştir (Çizelge 2). Peynir üretimi ve olgunlaştırılması aşamasında süt bileşenlerinden protein, yağ, laktoz ve sitrat enzimatik, kimyasal ve mikrobiyolojik yolla parçalanarak ve/veya transformasyona uğrayarak aroma bileşenlerini oluşturmaktadır (Avşar vd., 2011). Sütte bulunan doğal enzimler, starter mikroorganizmalar veya bu mikroorganizmaların lize olması sonucu salgılanan enzimler spesifik aroma ve lezzet bileşenlerinin oluşumunda görev almaktadır (Avşar vd., 2011). Çalışmamızda Çökelek peynirlerinde kimyasal yan gruplar baz alındığında 15 asit, 6 alkol, 21 ester, 6 hidrokarbon, 5 terpen ve 3 aromatik hidrokarbon tespit edilmiştir. 2-heptanon, benzen 1,3 dimetil, benzoik asit, bütanoik asit, dekanolik asit etil ester ve metil ester, D-limonen, dodekanoik asit peynir örneklerinin büyük çoğunluğunda saptanan uçucu bileşenler olmuştur. Çökelek peynirlerinde ester ve asitlerin yoğunlukta bulunduğu görülmüştür. Peynirlerde süt yağının parçalanması, laktoz ve sitrat metabolizması sonucunda asidik karakterli

uçucu bileşikler oluşabilmektedir (Molimard ve Spinnler, 1996). Asitler bunun yanında metil keton, ester ve terpenlerin öncül maddeleri

olabilmektedir (Collins vd., 2003; Curioni ve Bosset, 2002).

Çizelge 1. Çörekotlu Çökelek peynirlerinin fizikokimyasal özellikleri  
Table 1. Physicochemical properties of Çökelek cheese with black cumin

Parametre	Minimum değer	Maksimum değer	Ortalama± Standart Sapma
Kuru madde (%)	33.71	57.52	45.84±4.43
Kül (%)	2.03	9.29	5.52±1.81
Kuru maddede kül (%)	4.85	20.34	12.04±3.83
pH	4.38	6.32	5.16±0.43
Asitlik (% laktik asit)	0.18	1.17	0.80±0.32
Tuz (%)	1.87	7.72	4.72±1.23
Kuru maddede tuz(%)	6.20	16.90	10.39±2.90
Yağ (%)	3	10	5.50±2.30
Kuru maddede yağ (%)	6.40	22.05	11.68±5.50
Protein (%)	16.80	29.71	22.64±3.65
Kuru maddede protein (%)	35.16	71.83	51.02±11.46
<i>L</i>	42.65	48.69	45.08±1.64
<i>a</i>	-0.68	1.06	0.40±0.43
<i>b</i>	8.00	12.54	10.16±1.26

Çökelek peynirlerinde uçucu maddeleri arasında en yüksek konsantrasyona ortalama 48.06 mg/kg ile bütanoik asit sahip olmuştur. Süt ürünlerinde saptanan en temel yağ asidinin bütanoik asit olduğu ve peynirlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu bilinmektedir (Avşar vd., 2011; Nalbant ve Karagül Yüceer, 2020; Karaalioğlu vd., 2021). Gün vd. (2019) farklı yöntemlerle ürettikleri Çökelek peynirlerinin aroma bileşenleri arasında en yüksek konsantrasyona bütirik asitin sahip olduğunu belirlemiştir. Çalışmamızda Çökelek peynirlerinde bütanoik asite ilaveten oktanoik, n-hekzanoik ve n-hekzadekonoik asitte diğer asitlere göre daha yüksek düzeyde saptanmıştır. Nalbant ve Karagül Yüceer (2020) ve Karaalioğlu vd. (2021) oktanoik asitinde bütirik asitle beraber peynirlerde baskın olduğunu bildirmiştir.

Çökelek peynirlerinde uçucu bileşenlerden esterler sayıca fazla bulunmuştur. Esterler arasında en yüksek konsantrasyona hekzonoik asit etil ester ve oktanoik asit etil ester sahip olmuştur. Kısa zincirli yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu oluşan esterlerin algılama eşik değerleri düşük olduğundan dolayı peynir aroması üzerinde oldukça etkili olduğu bildirilmektedir (Karaalioğlu

vd., 2021). Esterler peynirde meyvemsi aromaya sebep olmaktadır ve bazı keskin aroma maddelerinin etkisini azaltabilmektedirler (Gallois ve Langlois, 1990).

Alkollerden 1-butanol, 3-metilasetat, silanediol, dimetil diğer alkollerden yüksek düzeyde saptanmıştır. Uzun (2022) farklı depolama sürelerinde inek ve deve peynirlerinde alkollerden silanediol, dimetil, terpenlerden D-limonen ve p-ksilen başta olmak üzere p-cymene, o-cymene ve o-ksilen Çökelek peynirlerinde tespit edilmiştir. Arslaner (2020) sade yoğurttaki silanediol dimetil saptamazken sarımsak ilaveli yoğurtlarda saptanmıştır.

Terpenler diğer aroma maddeleri gibi peynirde enzimatik veya kimyasal yollarla ortaya çıkan bileşikler olmayıp bitki kaynaklı uçucu maddelerdir (Avşar vd., 2011). Süt ve süt ürünlerinde terpenlerin oluşumunun hayvanların tükettikleri yemler ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Öztürkoğlu Budak vd., 2016). Terpenler bitkisel uçucu maddeler olduğundan çalışmamızda Çökelek peynirlerinde terpenlerin peynirlerin üretildiği süt yanında daha çok çörek otu kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Kıralan

(2014) çörek otu yağında, Dinagaran vd. (2016) çörek otu tanesinde limonen, p-cymene, Farhan vd. (2021) D-limonen ve p-cymene, Kabir vd. (2020) Bangladeş ve Hindistan çörek otlarında p-cymene, limonen, D-limonen terpenlerini saptamıştır. Burdock (2022) farklı ülkelerde yetişen çörek otlarının yağlarının temel bileşenleri arasında çalışmamızda da saptanan p-cymene ve limoneni saptamıştır. Bunların yanı sıra Uzun (2022) çalışmamıza benzer şekilde inek peynirinde o-cymene, p-cymene ve p-ksilen tespit etmiştir. Çökelek peynirlerinde keton sınıfında tespit edilen 2-heptanon ve 2-nonanon fermente süt ürünlerinde kremamsı, taze aromadan sorumlu bileşenler olarak bilinmektedir (Beshkova vd., 2003; Pionnier ve Hugelshofer, 2006). 2-heptanon ve 2-nonanonun çeşitli süt ürünlerinde tespit edilmiştir (Pionnier ve Hugelshofer, 2006; Dan vd., 2017; Gurkan, 2019; Yılmaz Kısrak, 2021). Çalışmamızda saptanan ketonlardan 2-undekanon ise mikrofiltrelenmiş pastörize sütte (Yue vd., 2015) ve bunun yanında bazı çörek otu yağlarında saptanmıştır (Burdock, 2022). Çalışmamızda Çökelek peynirlerinde hidrokarbonlardan oksim-metoksi fenil (Oxime-, methoxy-phenyl), ve stiren diğer

hidrokarbonlardan daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bunun yanında aromatik hidrokarbonlardan benzen, 1,4-dikloro, benzen, 1,3-dimetil tespit edilmiştir. Peynir örneklerinde metil benzen, stiren ve 1,2 diklorobenzenin en sık tespit edilen hidrokarbonlar olduğu belirtilmektedir (Ozturkoglu Budak vd., 2016; Kesenkaş, 2005). Çalışmamızda da bu uçucu maddelerden stiren tespit edilmiştir. Yue vd. (2015) pastörize sütlerde çalışmamıza benzer şekilde benzen 1,3 dimetil, fenol ve stiren uçucu bileşenlerini saptamıştır. Bunun yanında Çökelek peynirlerinde saptanan 1,3,5,7-siklooktatran bir diğer adıyla annulone hidrokarbonunun bitki-endofitik fungal tür (*Gliocladium* sp.) tarafından üretildiği bildirilmiştir (Stinson vd., 2003). Huang vd. (2011) *Candida intermedia* C410 suşu tarafından 1,3,5,7-siklooktatran hidrokarbonun açığa çıktığını saptamıştır. Literatürde peynirlerde 1,3,5,7-siklooktatran tespitine yönelik çalışmaya rastlanmamakla birlikte çalışmamızda Çörek otlı çökelek peynirlerinde saptanmıştır. Çökelek peynirlerinin aroma bileşenlerinin değerlendirildiği farklı bir çalışmada çalışmamızla ortak olarak tespit edilen bileşenler sadece bütirik ve hekzanoik asit olmuştur (Gün vd., 2019).

Çizelge 2. Çörekotlu Çökelek peynirlerinde saptanan uçucu bileşenler (n=40)

Table 2. Volatile compounds of Çökelek cheese with black cumin (n=40)

Uçucu bileşen/ Volatile compounds	Minimum	Maximum	Ortalama±Standart Sapma (mg/kg)/ Mean±Standard deviation (mg/kg)
<i>Asitler</i>			
Benzoik asit	TE	19.45	2.09±4.83
2,5-Dihidroksibenzoik asit, 3TMS	TE	0.66	0.31±0.20
Butanoik asit	TE	490.3	48.06±128.56
Dodekanoik asit	TE	33.85	2.54±7.19
Hekzanoik asit	TE	48.19	6.69±12.12
Heptanoik asit	TE	14.26	1.28±3.46
n-Dekanoik asit	TE	157.31	13.44±38.20
n-Hekzadekanoik asit	TE	131.09	17.01±38.83
Nonanoik asit	TE	37.13	5.62±10.88
Oktanoik asit	TE	330.27	17.48±61.92
9-Decenoik acid	TE	13.46	2.35±4.62
Palmitoleik asit	TE	27.43	9.92±15.17
Pentanoik asit	TE	20.43	4.37±7.89
Tridekanoik asit	TE	29.2	9.21±12.19
Fosfonoasetik asit 3TMS	TE	37.12	12.48±16.46



<i>Ketonlar</i>			
2-Heptanon	TE	28.88	2.86±6.87
2-Nonanon	TE	15.51	5.48±6.94
2-Undekanon	TE	7.5	1.42±2.49
<i>Alkoller</i>			
1-Oktanöl	TE	5.45	3.26±2.38
1-Propanol, 3-(metilthio)-	TE	35.28	9.01±17.51
1-Butanol, 3-metil-asetat	TE	207.82	30.40±78.23
Benzil alkol	TE	3.69	0.58±1.04
Feniletıl alkol	TE	160.4	15.15±37.87
Silanedıol, dimetil	TE	150.86	31.74±52.58
<i>Esterler</i>			
Butanoik asit, 3-metilbutıl ester	TE	22.11	2.64±6.84
Butanoik asit, butıl ester	TE	9.06	2.40±3.02
Butanoik asit, etıl ester	TE	104.62	8.52±24.93
Asetik asit, 2-feniletıl ester	TE	111.37	13.30±32.86
Arsenous asit, tris(trimetilsilil) ester	TE	26.11	4.28±8.33
Benzoik asit, etıl ester	TE	13.18	2.93±5.13
Dekanoik asit, etıl ester	TE	366.36	19.24±74.27
Dekanoik asit, metıl ester	TE	48.8	2.79±9.82
Dekanoik asit, propıl ester	TE	8.08	1.09±2.45
Dodekanoik asit, metıl ester	TE	14.06	1.59±3.94
Etil 9-decenoat	TE	52.12	4.05±13.33
Heptanoik asit, etıl ester	TE	11.34	2.16±4.15
Hekzadekanoik asit, etıl ester	TE	5.98	2.15±2.87
Hekzanoik asit, 2-metilpropıl ester	TE	9.56	5.22±4.65
Hekzanoik asit, etıl ester	TE	597.85	43.49±134.06
Hekzanoik asit, metıl ester	TE	227.607	24.33±61.12
Hekzanoik asit, propıl ester	TE	10.29	2.37±3.52
Oktanoik asit, etıl ester	TE	687.71	34.66±136.46
Oktanoik asit, metıl ester	TE	125.36	10.15±33.16
Tradekanoik asit, etıl ester	TE	23.41	6.97±9.73
<i>Hidrokarbonlar</i>			
Oksim metoksi fenil	TE	306.71	34.79±85.31
Fenol	TE	4.76	4.38±0.53
1,3,5,7-siklooktatran	TE	16.79	3.38±6.50
Stiren	TE	73.54	7.66±20.80
<i>Terpenler</i>			
D-Limonen	TE	158.08	13.44±34.71
p-Cymene	TE	15.58	5.94±8.34
o-Cymene	TE	38.02	8.52±14.56
o-ksilen	TE	2.14	1.10±0.65
p-ksilen	TE	118.72	19.68±39.16
<i>Aromatik hidrokarbonlar</i>			
Benzene, 1,4-dikloro	TE	50.42	7.18±17.49
Benzene, 1,3-dimetil	TE	18.91	3.52±6.06

TE: Tespit edilemedi/Not determined

### Yağ asitleri profili

Çökelek peynirlerinin yağ asitlerinin bileşimi Çizelge 3'de verilmiştir. Çökelek peynirlerinde doymuş yağ asitleri (SFA) %65.82, doymamış yağ asitleri (UNSFAs) %41.57 olarak saptanmıştır. Süt yağının SFA'sı benzersiz bir şekilde 4 ila 24 karbon atomu arasında değişen karbon zincir uzunluğuna sahip SFA'dan oluşmaktadır (Parodi, 2004). En yüksek düzeyde saptanan doymuş yağ asitleri sırasıyla palmitik (C16), miristik (C14), lignoceric (C24) ve trikosoanik asittir (C23). Doymamış yağ asitlerinin %29.32'ini tekli doymamış, %12.25'ini çoklu doymamış yağ asitleri oluşturmuştur. Tekli doymamış yağ asitleri (MUFA) arasında %21.06 oranıyla ilk sırada oleik asit (C18:1n9c) yer almıştır. Oleik asiti %6.13 oranıyla elaidic asit (C18:1n9t) takip etmiştir.

Çökelek peynirlerinde kısa zincirli yağ asitlerinden (KZYA) bütirik ve kaproik asit, orta zincirli yağ asitlerinden kaprilik, kaprik, laurik ve miristik asit, uzun zincirli yağ asitlerinden pentadekanoik, palmitik, araşidik, behenik, trikosoanik ve lignoceric asit saptanmıştır. Kısa zincirli yağ asitlerinin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri pek çok çalışmada bildirilmekte ve KZYA'nin günlük diyetle yer alması önerilmektedir (Hanuš vd., 2018). KZYA'ların özellikle kolon sağlığı açısından rolleri olduğu bilinmekle birlikte antienflamatuar, antitumor, antimikrobiyal etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir (Tan vd., 2014).

Bu çalışmada ayrıca bitkisel yağlar kaynaklı linoleik, linolenik ve eikosenoik asit saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak bu yağ asitlerinin çörek otu kaynaklı olduğu söylenebilir. Akrom ve Darmawan (2017), çörek otu yağ kapsülünde önemli düzeyde palmitik, linoleik, eikosenoik (araşidik) asit ve daha düşük düzeyde eikosenik saptamıştır.

Çökelek peynirlerinde Omega-3 yağ asitleri (C18:3n3, C20:3n3+C20:4n6, C20:5n3) %4,42, omega-6 yağ asitleri (C18:2n6, C18:2n6t, C20:3n6, C20:3n3+C20:4n6) %4,52 ve omega-9 yağ asitleri (C18:1n9c, C20:1n9, C22:1n9) %26.04 düzeyinde belirlenmiştir. n6/n3 oranı 1.02, aterosjenite indeksi (AI) değeri 1.51 olarak saptanmıştır

(Çizelge 3). Aşırı miktarda n-6 çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) ve çok yüksek bir n-6/n-3 oranı, günümüzün Batı diyetlerinde olduğu gibi, kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve inflamatuvar ve otoimmün dahil olmak üzere birçok hastalığın patogenezi desteklerken artan n-3 PUFA seviyeleri (düşük bir n-6/n-3 oranı) baskılayıcı etkiler göstermektedir (Wijendran ve Hayes, 2004; Simopoulos, 2002, 2008; Tóth vd., 2019; Paszczyk ve Łuczyn'ska, 2020).

AI, aterosjenik asitlerle ilgilidir (C12:0, C14:0 ve C16:0) (Karaman vd., 2022). AI, tekli yağ asitlerinin insan sağlığı üzerindeki farklı etkilerini ve özellikle ateros ve/veya trombus oluşumu gibi patojenik fenomenlerin insidansını artırma olasılığını hesaba katar. AI değeri, doymuş yağ asitlerinin toplamı ile doymamış yağ asitlerinin ana sınıflarının toplamı arasındaki ilişkiyi göstermektedir. AI ne kadar yüksekse, aterosjenik diyet bileşenleri o kadar fazladır. Düşük AI değeri, süt ve süt ürünlerinin koroner kalp hastalıklarına karşı koruma sağlayabileceğini göstermektedir (Paszczyk ve Łuczyn'ska, 2020). Cossignani vd. (2014), taze peynirlerde AI değerini 2.7, yarı sert peynirlerde 2.4 olarak saptamıştır. Paszczyk ve Łuczyn'ska (2020), inek peynirlerinde AI değerini 1.63, keçi peynirinde 1.78 ve koyun peynirinde 2.85 olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda Çökelek peynirlerinde trans yağ asitlerinden C18:1 9 trans, C18:2 6 trans ve C18:2 9 trans saptanmıştır. Literatürde Çökelek peynirlerinin yağ asitleri üzerine yapılmış araştırma sayısı sınırlıdır. Simsek ve Sagdic (2010) *L. helveticus* ve/veya yoğurt bakterileriyle üretilen Çökelek peynirlerinde SFA yüzdesinin depolama süresince örneğe göre değişmekle birlikte %58.89-74.43 aralığında değiştiğini saptamışlardır. Aynı araştırmacılar ürettikleri Çökelek peynirlerinde uzun zincirli yağ asitlerinden C20, C21, C22, C23 ve C24'ü tespit etmemişlerdir. Yine aynı araştırmacılar keçi sütünden Çökelek peyniri üretmişler ve yoğurt kültürü içeren örnekte çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde doymuş yağ asitlerinden palmitik asidin en yüksek düzeyde bulunduğunu bildirmişlerdir (Simsek ve Sagdic, 2012).

Çizelge 3. Çörekotlu Çökelek peynirlerinde saptanan yağ asitleri (n=40)

Table 3. Fatty acids of Çökelek cheese with black cumin (n=40)

Yağ asidi Fatty acid	Minimum	Maximum	Ortalama±Standart Sapma (mg/kg)/ Mean±Standard deviation (mg/kg)
C4: Bütirik asit	0.20	4.03	1.95±0.61
C6: Kaproik asit	0.14	2.70	1.40±0.47
C8: Kaprilik asit	0.27	8.61	3.66±1.64
C10: Kaprik asit	0.08	0.66	0.33±0.09
C12: Laurik asit	0.23	10.75	3.17±1.58
C13: Tridekanoik asit	0.07	3.673	0.67±1.26
C14: Miristik asit	1.78	15.33	9.31±2.78
C14:1: Miristiolenik asit	0.14	4.23	0.96±0.87
C15: Pentedekanoik asit	0.26	1.44	0.92±0.26
C15.1: cis-10-Pentadekanoik asit	0.13	0.70	0.30±0.09
C16: Palmitik asit	1.85	35.34	22.21±9.98
C16.1: Palmitolenik asit	0.09	26.05	2.02±6.64
C18:1n9t: Elaidik asit	0.39	16.25	6.13±5.93
C18:1n9c: Oleik asit	1.03	33.100	21.06±8.96
C18:2n6t: Linolelaidik asit	1.37	19.15	3.47±3.61
C18:2n9t: Metil elaidate	1.01	14.77	3.66±3.81
C18:2n6: Linolenik asit	0.02	5.23	0.77±1.13
C18:3n6: γ-Linolenik asit	0.34	2.19	0.81±0.69
C20: Araşidik asit	0.25	3.00	0.83±1.07
C18:3n3: α-Linolenik asit	0.67	2.48	1.45±0.50
C20:1n9: Eikosanoik asit	1.41	2.91	2.07±0.76
C21: Heneikosanoik asit	0.11	1.49	0.45±0.52
C22:2n6: Docosadienoic	0.06	0.20	0.10±0.03
C20:3n6: Homo- γ-Linolenik	0.05	0.39	0.19±0.08
C22: Behenik asit	0.11	0.26	0.18±0.04
C20:3n3+C20:4n6	0.07	0.10	0.09±0.01
C22:1n9: Erucic	0.10	13.73	2.91±5.11
C23: Trikosanoik asit	0.10	26.82	6.18±4.26
C20:5n3: EPA	0.13	7.42	2.88±3.54
C22:2n6: Docosadienoic	0.097	5.12	2.59±2.76
C24: Lignoceric asit	1.33	37.13	8.43±6.34
Doymuş yağ asitleri (SFA)	7.17	167.48	65.82±8.51
Doymamış yağ asitleri (UNSAFA)	5.65	122.80	41.57±5.77
Tekli doymamış yağ asitleri (MUFA)	2.90	80.72	29.32±10.00
Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA)	2.75	42.08	12.25±1.29
Omega-3 yağ asitleri	0.87	10.00	4.42±1.39
Omega-6 yağ asitleri	1.51	24.87	4.52±1.58
Omega-9 yağ asitleri	2.54	49.74	26.04±10.72
n6/n3	1.74	2.49	1.02
Aterojenite indeksi	0.87	1.63	1.51

## SONUÇ

Ülkemizin farklı yörelerinde üretilen Çökelek peyniri yüksek kuru maddesi ve protein düzeyiyle geleneksel peynir çeşitlerimiz arasında önemli bir yere sahiptir. Beyaz peynir, Tulum peyniri ve Kaşar peyniri gibi peynirlerden daha ucuz olması sebebiyle de tercih edilebilmektedir. Aydın ilinde de Çökelek peyniri çörek otu ilavesiyle geleneksel olarak üretilmekte ve bölge halkı tarafından yaygın bir şekilde tüketilmektedir. Bu anlamda düşünüldüğünde daha çok geleneksel olarak üretilen çörek otlı Çökelek peynirinin tanınırlığının daha fazla artması ve daha fazla ekonomik gelir sağlanabilmesi için endüstriyel boyutta üretiminin de yaygınlaşması gerekmektedir. Bu çalışmada Aydın ilinde geleneksel biçimde üretilen çörek otlı Çökelek peynirinin genel bileşimi, uçucu maddeleri ve yağ asitleri ortaya konmuştur. Yağ asitlerinden bütirik, kaprolik ve kaprik asit, uçucu bileşenlerden de 2-heptanon, benzen 1,3 dimetil, benzoik asit, bütanoik asit, dekanoik asit etil ester ve metil ester, D-limonen, dodekanoik asit peynir örneklerinin büyük çoğunluğunda saptanan uçucu bileşenler olmuştur. Bazı uçucu bileşenlerin daha az sayıda peynirde saptandığı görülmüştür. Çalışma sonuçlarına dayanarak yöresel üretim tekniği korunarak standardize edilecek çörek otlı Çökelek peyniri için coğrafi işaret alınmasının, üreticinin korunması, peynirin tanınırlığının ve pazarlama imkanlarının artmasıyla birlikte üretildiği bölgeye ve ülkemize önemli ekonomik kazanç sağlama potansiyeline sahip olacağı düşünülmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar başka kişiler veya kurumlar ile çıkar çatışması bulunmadığını bildirmektedir.

## YAZARLARIN KATKISI

Tüm yazarlar makalenin hazırlanması, yazımı ve yayınlanmasına katkıda bulunmuşlardır

## KAYNAKLAR

Akan, E., Yerlikaya, O., Akpınar, A., Karagozlu, C., Kinik, O., Uysal, H.R. (2021). The effect of various herbs and packaging material on antioxidant activity and colour parameters of

whey (Lor) cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 74: 554-563.

Akrom, A., Darmawan, E. (2017). Tolerability and safety of black cumin seed oil (Bcso) administration for 20 days in healthy subjects. *Biomedical Research-Tokyo*, 28: 4196-4201.

AOAC. (2003). Official methods of analysis, (17th edition), Association of Analytical Washington, DC, USA.

Arslaner, A. (2020). The effects of adding garlic (*Allium sativum* L.) on the volatile composition and quality properties of yoğurt. *Food Science and Technology*, 40(2): 582-591.

Avşar, Y.K., Karagül-Yüceer, Y., Hayaloğlu, A.A. (2011). *Peynirde Aroma. Peynir Biliminin Temelleri*, Hayaloğlu, A.A., Özer, B. (Editörler). Sıdaş Medya, İzmir, Türkiye, s.263-302.

Bannon, C. D., Craske, J. D., Hai, N. T., Harper, N. L., O'Rourke, K. L. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability: II. Methylation of fats and oils with boron trifluoridemethanol. *Journal of Chromatography A*, 247(1): 63-69.

Berkay Karaca, O., Taspınar, T., Güven, M. (2020). *Traditional Cheeses of Mediterranean Region in Turkey. Traditional Cheeses from Selected Regions in Asia Europe And South America*. Oluk, C. E., Berkay Karaca O. (Editors), Bentham Books, Sharjah, U.A.E, pp.307-336.

Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I.I., Simov, Z.I., Dimitrov., Z.P. (2003). Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal* 13: 529-535.

Bialek, A., Bialek, M., Lepionka, T., Czerwonka, M., & Czauderna, M. (2020). Chemometric analysis of fatty acids profile of ripening chesses. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(8), 1814.

Bradley, R. L., Arnold, E., Barbano, D. M., Semerad, R. G., Smith, D. E., Vines, B. K. (1993). Chemical and physical methods. Standard methods for the examination of dairy products, Marshall, R. T. (Ed), American Public Health Association, Washington DC.

- Burdock, G.A. (2022). Assessment of black cumin (*Nigella sativa* L.) as a food ingredient and putative therapeutic agent. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 128: 105088.
- Celem, E., Celik, O.F., Tarakcı, Z. (2018). The effects of ripening on some physicochemical and microbiological characteristics of Çökelek cheeses: A market survey of fresh and skin-ripened Çökelek. *Journal of Central European Agriculture*, 19(2): 335-348
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G. (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*. 13: 841- 866
- Cossignani, L., Giua, L., Urbani, E., Simonetti, M.S., Blasi, F. (2014). Fatty acid composition and CLA content in goat milk and cheese samples from Umbrian market. *European Food Research and Technology*, 239: 905-911.
- Curioni, P.M.G., Bosset, J.O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12: 959–984.
- Çakmakçı, S. (2011). *Türkiye Peynirleri. Peynir Biliminin Temelleri*, Hayaloğlu, A.A., Özer, B. (Editörler). Sıdaş Medya, İzmir, Türkiye, s.739-771.
- Çakmakçı, S., Salık M.A. (2021). Türkiye'nin coğrafi işaretli peynirleri. *Akademik Gıda*, 19(3): 325-342.
- Çardak, A.D. (2012). Microbiological and chemical quality of Çökelek cheese, Lor cheese and Torba (strained) yoghurt. *African Journal of Microbiology Research*, 6(45): 7278-7284.
- Dan, T., Wang, D., Jin, R.L., Zhang, H.P., Zhou, T.T., Suni, T.S. (2017). Characterization of volatile compounds in fermented milk using solid-phase microextraction methods coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 100(4): 2488-2500.
- Dervisoglu, M., Tarakci, Z., Aydemir, O., Temiz, H., Yazici, F. (2009). A Survey on selected chemical, biochemical and sensory properties of Kes cheese, a traditional Turkish cheese. *International Journal of Food Properties*, 12(2): 358-367.
- Farhan, N., Salih, N., Salimon, J. (2021). Physiochemical properties of Saudi *Nigella sativa* L. ('Black cumin') seed oil. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 28, 11.
- Fox P.F, Law J, McSweeney P.L.H, Wallace J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. In: Fox PF (ed), Chapman and Hall, London UK. pp. 389-438.
- Gallois, A., Langlois, D. (1990). New results in the volatile odorous compounds of French cheeses. *Le Lait, INRA Editions*, 70(2): 89-106.
- Gün, İ., Güneşer, O., Karagül Yüceer, Y., Güzel Seydim, Z.B., Torun, F., Çakıcı, S. (2019). Aromatic and sensorial properties of Çökelek cheese produced by different methods. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23: 131-138
- Hanuš, O., Samková, E., Křížová, L., Hasoňová, L., Kala, R. (2018) Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability-A Review. *Molecules*, 23, 1636.
- Huang, R., Li, G. Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H. J., Jiang, D. H., Huang, H. C. (2011). Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101(7): 859–869.
- Kabir, Y., Akasaka-Hashimoto, Y., Kubota, K., Komai, M. (2020). Volatile compounds of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds cultivated in Bangladesh and India. *Helvion*, 6(10): e05343.
- Kamber, U. (2008). The traditional cheeses of Turkey: cheeses common to all regions. *Food Review International*, 24: 1-38.
- Karaalioglu, O., Günay, E., Karagül Yüceer, Y. (2021). Tire Çamur peynirinin bazı fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri. *GIDA*, 46(4): 914-924.
- Karabulut, I., Hayaloğlu, A.A., Yıldırım, H. (2007). Thin-layer drying characteristics of kurut, a Turkish dried dairy by-product. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 1080-1086.

- Karagozlu, C., Tonguç İ.E. (2020). Traditional cheeses from selected regions in Asia, Europe, and South America., *Current -Developments in Food and Nutrition Research*, Chapter: Vol. 1, 277-306, Publisher: Bentham Science.
- Karaman, A.D., Akgül, F.Y., Ögüt, S., Canbay, H.S. and Alvarez, V. (2022). Gross composition of raw camel's milk produced in Turkey. *Food Science and Technology*, 42: e59820.
- Kavaz, A., Arslaner, A., Bakırcı, İ. (2012). Comparison of quality characteristics of Çökelek and Lor cheeses. *African Journal of Biotechnology*, 11(26): 6871-6877.
- Kesenkaş, H. (2005). Beyaz peynir üretiminde bazı mayaların starter kültür olarak kullanım olanaklarının araştırılması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, İzmir,Türkiye, 210s.
- Khosrowshahi, A., Madadlou, A., Mousavi M.E., Djomeh, Z.E. (2006). Monitoring the chemical and textural cheese during ripening of Iranian White cheese made with different concentrations of starter. *Journal of Dairy Science*, 89: 3318-3325.
- Kıralan, M. (2014). Changes in volatile compounds of black cumin (*nigella sativa* L.) Seed oil during thermal oxidation. *International Journal of Food Properties*, 17(7): 1482-1489.
- Kırdar, S.S. (2003). Çökelek peynirinin yapılışı ve özellikleri üzerine bir araştırma. GAP III. Tarım Kongresi, 02-03 Ekim 2003, Şanlıurfa, Türkiye, 441-443.
- Molimard, P., Spinnler, H.E. (1996). Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79: 169-184.
- Nalbant, D., Karagül Yüceer, Y. (2020). İnek ve keçi sütü kullanılarak üretilen probiyotik fermente süt ürünlerinin karakteristik özellikleri. *GIDA*, 45(2): 315-328.
- Önganer, A., Kirbag, S. (2009). Diyarbakir'da taze olarak tüketilen çökelek peynirlerinin mikrobiyolojik kalitesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 25(1-2): 24-33.
- Öztürkoğlu Budak, S., Gürsoy, A., Aykas, D.P., Koçak, C., Dönmez, S., de Vries, R.P., Bron, P.A. (2016). Volatile compound profiling of Turkish Divle cave cheese during production and ripening. *Journal of Dairy Science*, 99: 5120-5131
- Parodi, P. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59: 3-8.
- Paszczyk, B., Łuczyńska, J. (2020). The comparison of fatty acid composition and lipid quality indices in hard cow, sheep, and goat cheeses. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(11): 1667p.
- Pionnier, E., Hugelshofer, D. (2006). Characterisation of key odorant compounds in creams from different origins with distinct flavors. *Developments in Food Science*, 43: 233-236
- Polychroniadou, A., Michaelidou, A., Paschaloudis, N. (1999). Effect of time, temperature and extraction method on the trichloroacetic acid-soluble nitrogen of cheese', *International Dairy Journal*, 9(8): 559-568.
- Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 56: 365-379.
- Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 233: 674-688.
- Simsek, B., Sagdic, O. (2010) Determination of fatty acids and chemical characteristics of çökelek cheese from cows milk using of *L. helveticus* and/or yoghurt bacteria. *Food Science and Technology Research*, 16(3): 179-184.
- Simsek, B., Sagdic, O. (2012). Effects of starter culture types and different temperatures treatments on physicochemical, microbiological and sensory characteristics, and fatty acid compositions of Çökelek cheese made from goat milk. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(2): 177-183.
- Stashenko, E.E., Martínez, J.R. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 235-242.

- Stinson, M., Ezra, D., Hess, W. M., Sears, J., Strobel, G. (2003). An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Science*, 165: 913-922
- Sulejmani, E., Hayaloglu, A.A. (2016). Influence of curd heating on proteolysis and volatiles of Kashkaval cheese. *Food Chemistry*, 211: 160-170.
- Şanlı, T., Anlı, E.A. (2020). Çökelek peyniri üretiminde alternatif kaynak olarak kefir kullanımı. *GIDA*, 45(1): 139-149
- Şanlıdere Aloğlu, H., Turhan, İ., Öner, Z. (2012). Minci (Minzi) peynirinin özelliklerinin belirlenmesi. *GIDA*, 37(6): 349-354.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease, *Advances in Immunology*, 121: 91-119.
- Tarakci, Z., Temiz, H., Aykut, U., Turhan, S. (2011). Influence of wild garlic on color, free fatty acids, and chemical and sensory properties of herby pickled cheese. *International Journal of Food Properties*, 14: 287-299.
- Tóth, T., Mwau, P.J., Bázár, G., Andrásy-Baka, G., Hingyi, H., Csavajda, E., Varga, L. (2019). Effect of feed supplementation based on extruded linseed meal and fish oil on composition and sensory properties of raw milk and ultra-high temperature treated milk. *International Dairy Journal*, 99: e104552
- Uzun, H. (2022). Deve sütünden üretilen peynirlerin besin içeriğinin ve depolama süresince meydana gelen fizikokimyasal değişimlerin belirlenmesi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, Türkiye, 71s.
- Wijendran, V., Hayes, K.C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24: 597-615.
- Yılmaz Kısarak, E. (2021). Koyun ve keçi sütlerinden üretilen İzmir tulum peynirinin biyoaktif özelliklerinin ve uçucu bileşiklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Malatya, Türkiye, 116s.
- Yue, J., Zheng, Y., Liu, Z., Deng, Y., Jing, Y., Luo, Y., Yu, W., Zhao, Y. (2015). Characterization of Volatile Compounds in Microfiltered Pasteurized Milk Using Solid-Phase Microextraction and GC×GC-TOFMS, *International Journal of Food Properties*, 18(10): 2193-2212.

## ELMA KABUĞUYLA BESLENEN *TENEBRIO MOLITOR* LARVALARININ FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE LARVAL FERMANTASYONUN ELMA KABUĞUNUN FENOLİK PROFİLİNE ETKİSİ

Sedanur DEMİRBAŞ YILDIZ, Zehra GÜLSÜNOĞLU KONUŞKAN\*

İstanbul Aydın Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

Geliş/Received: 22.07.2024; Kabul /Accepted: 24.09.2024; Online baskı /Published online: 04.10.2024

Demirbaş Yıldız, S., Gülsünoğlu Konuşkan. Z. (2024). Elma kabuğuyla beslenen *Tenebrio molitor* larvalarının fizikokimyasal özellikleri ve larval fermantasyonun elma kabuğunun fenolik profiline etkisi. GIDA (2024) 49 (5) 981-995 doi: 10.15237/ gida.GD24072

Demirbaş Yıldız, S., Gülsünoğlu Konuşkan. Z. (2024). Physicochemical properties of *Tenebrio molitor* larvae feeding on apple peel and the effect of larval fermentation on the phenolic profile of apple peel. GIDA (2024) 49 (5) 981-995 doi: 10.15237/ gida.GD24072

### ÖZ

Bu çalışma, *Tenebrio molitor* larvalarının elma kabuklarını değerlendirme potansiyeli ve larval fermantasyonun elma kabuğunda bulunan fenolik maddeler, larvaların gelişme potansiyelleri ve fizikokimyasal özellikleri üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamıştır. Mısır unu ve elma kabuğu farklı oranlarda (1:1, 1:2, 1:4) karıştırılmış ve fermantasyon 12 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. 1:1 oranındaki besiyerinde (EMB) önemli değişiklikler gözlenmiş ve larva ağırlığı, kontrol (%58.6) ile karşılaştırıldığında %62.2 oranında artış göstermiştir. 12. gün sonunda larvaların kül, protein ve karbohidrat içeriklerinde artış, ancak yağ içeriğinde azalma görülmüştür. EMB besiyerinin fenolik içeriği ve antioksidan aktiviteleri başlangıç değerlerine kıyasla önemli ölçüde artarak 8. günde maksimum seviyesine ulaşmıştır. EMB besiyerinde dört farklı kuersetin türevi tespit edilmiştir: Kuersetin-3-rutinozit, kuersetin-3-O-glukozit, kuersetin-3-O-galaktozit ve kuersitrin. 8 gün sonra, kuersitrin ve kuersetin-3-O-glukozit miktarları başlangıç değerlerine kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Bu bulgular, *T. molitor* larvalarının gıda atıklarını fenolik salınım veya dönüşüm yoluyla değerli fonksiyonel gıda bileşenlerine dönüştürebileceğini göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Tenebrio molitor*, elma kabuğu, fenolik madde, larval fermantasyon

## PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF *TENEBRIO MOLITOR* LARVAE FEEDING ON APPLE PEEL AND THE EFFECT OF LARVAL FERMENTATION ON THE PHENOLIC PROFILE OF APPLE PEEL

### ABSTRACT

This study explores the potential of *Tenebrio molitor* larvae to valorize apple peels and assesses larval fermentation's impact on phenolics, growth potential and physicochemical properties of the larvae. Corn flour and apple peel were mixed in different ratios (1:1, 1:2, 1:4), and fermentation was conducted for 12 days. Significant changes occurred in the 1:1 ratio (EMB); larval weight increased by 62.2% compared to 58.6% in the control. After 12 days, the larvae showed increased ash, protein

\* Sorumlu yazar/ *Corresponding author*

✉ zehragulsunoglu@aydin.edu.tr

☎ (+90) 505 823 0395

Zehra Gülsünoğlu Konuşkan; ORCID no: 0000-0001-6497-1912



and carbohydrate contents, but reduced fat content. The phenolic content and antioxidant activities of the EMB medium significantly increased compared to the initial values, reaching their maximum level on day 8. Four quercetin derivatives were detected: quercetin-3-rutinoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-galactoside and quercitrin. After 8 days, the amounts of quercitrin and quercetin-3-O-glucoside increased significantly. These findings suggest that *T. molitor* larvae can convert food waste into valuable functional food ingredients through phenolic release or conversion.  
**Keywords:** *Tenebrio molitor*, apple peel, phenolic compounds, larval rearing

## GİRİŞ

Entomofaji olarak adlandırılan böceklerin insanlar tarafından tüketilmesi Asya, Afrika, Latin Amerika gibi birçok bölgede görülmektedir. Son yıllarda, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından bazı böceklerin geleneksel hayvancılığa sürdürülebilir bir alternatif olarak güvenle tüketilebileceğinin bildirilmesi ile yenilebilir böceklerin insan gıdası olarak kullanılması konusu araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Böceklerin yüksek kaliteli proteinler, çoklu doymamış yağ asitleri, lifler ve bazı mikro besinler açısından zengin olmasının yanı sıra yemden yararlanma oranlarının yüksek olması, ekolojik ayak izinin düşük olması ve hayvancılık üretimine kıyasla toprağa daha az bağımlı olmaları sebebiyle önemli bir kaynak konumundadırlar (Li vd., 2013; Lawal vd., 2021). Tüm dünyada 1500'den fazla yenilebilir böcek türü, yüksek protein içerikleri sebebiyle, bütün halde veya böcek unu şeklinde gıda ürünlerine dahil edilerek tüketilmektedir (Navarro del Hierro vd., 2020).

Un kurdu olarak da bilinen *Tenebrio molitor*, yüksek protein içeriği, dengeli aminoasit profili, verimli yem dönüşüm oranı, düşük sera gazı emisyonu, düşük su tüketimi ve az arazi kullanımı nedeniyle böcek yetiştiriciliği için uygun bir adaydır (Liu vd., 2020). *T. molitor* larvaları buğday kepeği üzerinde yetişebilir; ancak, hayatta kalma oranları, gelişme süreleri, larva ağırlığı ve kimyasal kompozisyonu uygulanan diyet şekline etkilenir. Muz kabukları, karpuz kabukları, yumurta kabukları, küspeler (örneğin, keten tohumu, chia tohumu, kenevir tohumu ve kolza tohumu), zeytin posası, havuç posası, patates kabukları, bira mayası, ekme ve kurabiye kıntıları gibi çeşitli organik atıklar larvaların besin bileşimini değiştirmek, larva ağırlığını ve hayatta kalma oranını arttırmak, gelişme süresini azaltmak ve üretim maliyetlerini

düşürerek böcekleri daha ekonomik hale getirmek için araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Oonincx vd., 2015; Tang vd., 2018; Ruschioni vd., 2020; Lawal vd., 2021; Rovai vd., 2021). Ayrıca, literatürde, *T. molitor* larvalarının antioksidan özelliklerini, fenolik profilini ve uygulanan diyet bileşenlerinde mevcut fenoliklerin *T. molitor* larvaları tarafından ne kadarının depolandığını inceleyen çalışmalar bulunmaktadır (Liu vd., 2020; Navarro del Hierro vd., 2020; Antonopoulou vd., 2022; Gulsunoglu-Konuskan ve Dag, 2024). Ancak, bu çalışmalar dışında, *T. molitor* larvalarının fenolik bileşenlerin biyodönüşümüne olan etkilerinin incelenmesi konusunda literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile elma kabuklarının *T. molitor* larvaları tarafından besin olarak kullanılması ile larval sindirim enzimlerinin ve larva mikrobiyotasının etkisi ile elma kabuklarının fenolik profilinde meydana gelebilecek değişimler incelenerek literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Elma tüm dünyada yaygın olarak tüketilen meyve türlerinden biridir. FAO 2022 yılı verilerine göre, tüm dünyada yıllık elma üretimi yaklaşık 143.5 milyon ton olup, en iyi beş üretici ülke ise sırasıyla Çin, Türkiye, Amerika, Polonya ve Hindistan'dır (FAOSTAT, 2024). Elma endüstriyel olarak çoğunlukla reçel, meyve suyu ve jöle üretimi için kullanılır. Elmanın kabuğu ve posası da dahil olmak üzere meydana çıkan atıklar, orijinal meyvenin yaklaşık %30'unu oluşturur ve bu atıkların ciddi çevre kirliliğine neden olması, yüksek oranda biyolojik olarak parçalanabilir olması sebebiyle bertaraf edilmesi gereklidir. Bu atıkların hayvan yemi olarak kullanılması veya direk olarak çevreye atılması yerine, yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülmesi hem ekonomik hem de ekolojik olarak fayda sağlayacaktır. Elma

atıklarının enzim, protein, organik asitler, etanol, aroma bileşikleri, doğal antioksidanlar ve pektin gibi yüksek değerli bileşiklerin üretiminde kullanılabilmesi yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gullón vd., 2008; Dhillon vd., 2012; Madrera vd., 2015; Hernández-Carranza vd., 2016). Ayrıca, elma posası ve kabuğu fenolik bileşik kaynağı olarak da kullanılabilir. Elma, et kısmında başlıca 5-O-kafeoilkuinik asit, prosiyanidin B2 ve (-)-epikateşin olmak üzere birçok biyoaktif fenolik bileşik içerirken, kabuğunda ise (-)-epikateşin ve kuersetin glikozitleri baskındır (Marks vd., 2007).

Bu çalışmada, *T. molitor* larvalarının elma kabuğu ile zenginleştirilmiş besiyerinde beslenmesi ile larval ağırlık, canlılık oranı ve kimyasal kompozisyonunda meydana gelen değişim incelenmiştir; ayrıca, *T. molitor* larvaları ile fermente edilen elma kabuğunun fenolik bileşenlerinde meydana gelen değişimin araştırılması hedeflenmiştir.

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### Materyal

*T. molitor* larvaları (3. evre) Mira Canlı Hayvan ve Böcek Turizm İnşaat Tarım Sanayi Co. (Antalya, Türkiye)'den satın alınmıştır. Elma (Starking çeşidi) ve mısır unu İstanbul'da bulunan yerel bir marketten temin edilmiştir. Kimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, HPLC ve UPLC-ESI-QqQ-MS/MS analizleri için kullanılan kimyasallar ise ultra saf olup Merck İlaç Ecza ve Kimya Tic. A.Ş.'den temin edilmiştir.

#### Atıkların Hazırlanması

Elmalar öncelikle yıkanmış, daha sonra meyve soyacağı kullanılarak soyulmuştur. Soyulan elma kabukları -20 °C'de dondurulmuş ve liyofilizatör kullanılarak kurutulmuştur. Liyofilizatörde (Teknosem, İstanbul, Türkiye) kurutma, 24 saat süre ile 0.001 mBar basınç altında -55°C'de gerçekleştirilmiştir. Kurutulan elma kabukları, daha sonra paslanmaz çelik öğütücü (IKA, Wilmington, North Carolina, ABD) kullanılarak toz haline getirilmiş ve larval fermantasyonda kullanılmak üzere -20 °C'de depolanmıştır.

#### Besiyerlerinin Hazırlanması

Bu çalışmada referans ve 3 deneme grubu olmak üzere toplam 4 farklı besiyeri modeli oluşturulmuştur. Her bir model için toplam 25 g mısır unu ve elma kabuğu karışımı farklı oranlarda (1:1, 1:2 ve 1:4) karıştırılarak kavanozlara aktarılmış ve kavanozlar hava akımına izin verecek delikli kapaklarla kapatılmıştır. Besiyerinin nem içeriği yaklaşık %40 olacak şekilde ayarlanmış ve yüzey kurummasının engellenmesi için inkübatöre içi su dolu bir beher yerleştirilmiştir. Referans örneği olarak ise 25 g mısır unu kullanılmıştır.

#### Larval Fermantasyon

Hazırlanan kavanozların her birine 50 adet *T. molitor* larvası ilave edilmiş ve 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her farklı besiyeri için toplamda 12 kavanoz hazırlanmıştır. Larval fermantasyonun 0., 4., 8. ve 12. gününde kavanozlar inkübasyondan alınmış ve larvalar toplanarak olası kalıntılardan arındırmak için yıkanmış ve kâğıt havlu ile kurutulmuştur. İlk olarak, larvaların canlılık sayısı, ağırlık kazanımı ve hacim değerleri belirlenmiş, daha sonra hem larvalar hem de larval fermantasyon sonrası besiyerleri ilerleyen analizlerde kullanılmak üzere -20 °C'de depolanmıştır.

#### Larvaların Ağırlık Kazanımı, Canlılık Sayısı ve Hacim Değerleri

Larval fermantasyon sonrası kavanozlar inkübasyondan alınmış ve her kavanozdaki larva canlılık sayısı belirlenmiş ve ağırlık kazanımları hassas terazi kullanılarak ölçülmüştür. Başlangıç larva sayısı ve ağırlığına göre, canlılık sayısı (Formül 1) ve ağırlık kazanımı (Formül 2) aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Canlılık sayısı (\%)} &= \frac{\text{İnkübasyon sonrası canlı larva sayısı}}{\text{Başlangıç larva sayısı}} \times 100 & 1 \\ \text{Ağırlık kazanımı (mg)} &= \frac{M_1 - M_0}{\text{Canlı larva sayısı}} & 2 \end{aligned}$$

Formül 2'de kullanılan  $M_1$ : inkübasyon sonrası toplam larva ağırlığı,  $M_0$ : inkübasyon öncesi toplam larva ağırlığı ifade etmektedir.

Larva hacimleri, uzunluk (mm), genişlik (mm) ve kalınlığın (mm) çarpılması ile hesaplanmıştır. Larvaların başlangıçta sahip olduğu hacmin ve inkübasyon sonrası kazandığı hacmin hesaplanmasında 10'ar adet larva kullanılmış ve dijital kumpas yardımıyla ölçümler alınmıştır. Hacim sonuçları mm<sup>3</sup> cinsinden verilmiştir.

#### **Larvaların Kimyasal Kompozisyon Analizleri**

Ağırlık kazanımı belirlendikten sonra larvaların kimyasal kompozisyonunu belirlemek amacıyla nem, kül, toplam protein, toplam yağ ve toplam karbohidrat analizleri yapılmıştır. Larvaların nem ve kül analizi AOAC (2000) metoduna göre gravimetrik olarak belirlenmiştir. Toplam protein miktarını belirlemek amacıyla Kjeldahl yöntemi kullanılmıştır (AOAC, 2000). Protein dönüşüm faktörü, larvaların içerdiği protein olmayan nitrojen içeriği dikkate alındığında 4.76 olarak belirlenmiştir (Janssen vd., 2017). Larvaların yağ içeriği AOAC (2000)'de belirtilen Soxhlet yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Çözgen olarak petrol eteri kullanılmış ve ekstraksiyon sonrası döner buharlaştırıcı ile çözgen uzaklaştırılarak toplam yağ miktarı hesaplanmıştır. Toplam karbohidrat miktarı ise; larva toplam kuru ağırlığından protein, yağ ve kül miktarı çıkarılarak hesaplanmıştır (Gulsunoglu vd., 2019). Sonuçlar kuru madde (km) bazında % cinsinden ifade edilmiştir.

#### **Fenolik Madde Ekstraksiyonu**

Larval fermentasyon sonrası besiyerinin antioksidan aktivitesini, fenolik madde miktarını ve profilini belirlemek amacıyla çözgen ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır (Andreadis vd., 2022). Larval fermentasyon sonrası besiyerinden 1 g örnek tartularak santrifüj tüplerine konulmuş ve üzerine 2.5 mL %80'lik metanol (%0.1 formik asit ilaveli) ilave edilerek 30 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra santrifüj tüpleri 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı kısım yeni bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Kalan katı kısma tekrar 2.5 mL %80'lik metanol (%0.1 formik asit ilaveli) eklenip aynı işlemler tekrarlanmış ve santrifüj sonrası elde edilen sıvı kısımlar aynı santrifüj tüpünde toplanarak antioksidan aktivite

ve fenolik madde analizleri için -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **Toplam Fenolik (TPC) ve Toplam Flavonoit Madde (TFC) Tayini**

TPC'nin belirlenmesi için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmış (Singleton vd., 1999) ve sonuçlar, mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/100 g km cinsinden verilmiştir. TFC miktarı ise kolorimetrik yöntemle tespit edilmiştir (Dewanto vd., 2002). Standart olarak kateşin kullanılmış ve sonuçlar mg kateşin eşdeğeri (CE)/100 g km olarak ifade edilmiştir.

#### **Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi**

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve CUPRAC (bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi) analizleri yapılmıştır. DPPH analizi, Rai vd. (2006) yöntemine göre yapılmıştır. CUPRAC analizi ise Apak vd. (2004) belirlediği yöntem kullanılarak yapılmıştır. Her iki antioksidan aktivite için sonuçlar mg trolox eşdeğeri (TE)/100 g km cinsinden ifade edilmiştir.

#### **HPLC ve UPLC-ESI-QqQ-MS/MS ile Fenolik Madde Profilinin Tespiti**

Larval fermentasyon sonrası besiyerinin içerdiği fenolik bileşenlerin kantitatif ve kalitatif analizleri HPLC ve UPLC-ESI-QqQ-MS/MS cihazları kullanılarak yapılmıştır. HPLC ile fenolik bileşenlerin kantitatif analizinde Capanoglu vd. (2008) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle göre; ekstraktlar, 0.45 µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra HPLC sistemine verilmiştir. HPLC sistemi Waters 600 kontrol birimi, Waters 996 photodiodearray (PDA) dedektör ve 40 °C'deki kolondan oluşmaktadır. Kullanılan kolon, C18 kolondur (25 cm x 4.60 mm, 5µm). Çözgen sistemi olarak A (%0.05 trifloroasetik asit ile asitlendirilmiş su) ve B (%0.05 trifloroasetik asit içeren asetonitril) kullanılmıştır. Akış hızı dakikada 1 mL şeklinde ayarlanmış ve ekstrakttaki bileşenlerin ayrılması, %5'den %30'a kadar çıkan lineer asetonitril gradiyenti kullanılarak 60 dakikalık analiz süresince gerçekleştirilmiştir. Örneklerde tespit edilen kuersetin türevleri 360

nm dalga boyunda tanımlanmıştır. Elde edilen piklerden alan-konsantrasyon çevrimi standartlar ile hazırlanan kalibrasyon eğrileri kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar µg/g km cinsinden verilmiştir.

Larval fermantasyon sonrası besiyerinde fenolik bileşenlerin kalitatif analizi UPLC-ESI-QqQ-MS/MS cihazı kullanılarak Catalkaya vd. (2022) belirlediği yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemin detayları ise; ekstraktlar 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildikten sonra 5 µL ekstrakt, 45 °C sıcaklığa ayarlanmış ve Acquity HSS T3 C18 kolonuna (2.1 mm x 100 mm x 1.8 µm) enjekte edilmiştir. Mobil faz, A (ultra saf su:formik asit, 100:0.1) ve B (asetonitril:formik asit, 100:0.1) karışımından oluşmaktadır. Ekstrakttaki bileşenlerin ayrılması doğrusal gradyan program (0 dakika: %95 A; 0–6.48 dakika: %65A; 6.48–6.77 dakika: %25A; 6.77–7.06 dakika: %65 A; 7.06–7.20 dakika: %95 A; 7.20–8.50 dakika: %95 A) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hem pozitif hem de negatif iyonizasyon modları şu parametreler kullanılarak yapılmıştır: Desolvasyon sıcaklığı: 600 °C; iyon kaynağı sıcaklığı: 150 °C; kapiler voltaj: 3.5 kV; desolvasyon gazı akış hızı: 1000 L/saat; koni gazı akış hızı: 50 L/saat. Veri toplama ve analiz, Waters MassLynx 4.1 yazılımı (Waters.Co) kullanılarak yapılmıştır. Larval fermantasyon sonrası besiyerindeki fenolik bileşenler, elde edilen kütle verileri ile mevcut standartların kütle verilerinin karşılaştırılması yoluyla tanımlanmıştır.

### İstatistiksel Analiz

Tüm denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler için Minitab 18 (Minitab Inc. Coventry, İngiltere) programı kullanılmış, örnekler arasındaki farklılıklar One-way Anova kullanılarak Tukey farklılık testine göre 0.05 önem düzeyinde belirlenmiştir. Değişkenler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan Pearson korelasyon katsayısı Microsoft Excel kullanılarak hesaplanmıştır.

### SONUÇ VE TARTIŞMA

#### Larvaların Büyüme Performanslarının Belirlenmesi

Bu çalışma, mısır unu ile beslenen bir referans grubu ve 1:1, 1:2, 1:4 oranlarında mısır unu:elma

kabuğu ile beslenen üç farklı çalışma grubundan oluşmaktadır. Referans ve çalışma grupları, fermantasyonun 0., 4., 8. ve 12. günlerinde inkübasyondan alınarak ağırlık kazanımları, canlılık sayısı ve hacim ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda 1:2 ve 1:4 oranında hazırlanan çalışma gruplarına ait larvaların ağırlıklarında başlangıç ağırlıklarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir. Buna karşın, 1:1 mısır unu:elma kabuğu ile beslenen larvaların ağırlıklarında başlangıç ağırlığına göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Yüksek miktarda elma kabuğu içeren besiyerinde beslenen larvaların ağırlıklarında meydana gelen azalma, elma kabuklarının içerdiği tanen miktarı ile ilişkilendirilebilir. Farklı elma çeşitleri ile yapılmış bir çalışmada elma kabuklarının kondanse tanen içeriğinin 14.2–42.9 mg/g km aralığında değiştiği rapor edilmiştir (Lees vd., 1995). Tanenler sindirim enzimleri ve proteinler ile birleşerek sindirim süreçlerini etkileme eğiliminde olmalarından dolayı larval gelişimi baskılayarak ağırlık kazanımını olumsuz etkilemiş olabilirler (Antonopoulou vd., 2022). Ağırlık kazanımında meydana gelen azalma dolayısıyla 1:2 ve 1:4 oranları ilerleyen çalışmalara dahil edilmemiş, ve çalışmanın bu kısmından sonrası için sadece mısır unu içeren besiyeri kontrol grubu olarak ve 1:1 mısır unu:elma kabuğu ile hazırlanan besiyeri ise EMB olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 1'de, kontrol ve EMB besiyerinde beslenen larvaların 0., 4., 8. ve 12. günlerdeki ağırlık kazanımları, hacim değerleri ve canlılık oranları verilmiştir. Fermantasyon süresinin artışı ile her iki besiyerinde de ağırlık kazanımı istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $P < 0.05$ ). Kontrol besiyerinde beslenen larvalar 12. gün sonunda başlangıca göre %58.65 oranında ağırlık artışı gösterirken, EMB besiyerinde beslenen larvalarda ise %62.21 oranında ağırlık artışı gözlenmiştir. Ancak, istatistiksel olarak incelendiğinde elma kabuğu ilavesinin larvaların ağırlık artışında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişime sebep olmadığı görülmüştür ( $P > 0.05$ ). Antonopoulou vd. (2022) %100 keçiyoynuzu ile beslenen *T. molitor* larvalarının

ağırlık kazanımlarının istatistiksel olarak kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğunu, ayrıca %0, %25, %50 ve %75 oranında keçiyoynuzu içeren buğday kepeği besiyerlerinde ise anlamlı bir farklılığın olmadığını rapor etmişlerdir. Kontrol ve EMB besiyerinde beslenen larvaların hacimleri 12. gün sonunda başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $P < 0.05$ ). Kontrol besiyerinde beslenen larvaların hacimleri %47.48 oranında artarken, EMB besiyerinde beslenen larvaların hacimleri ise %74.10 oranında artmıştır. Elma kabuğu ilave edilen besiyerinde beslenen larvaların kontrol grubuna kıyasla hacimleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Literatürdeki

başka bir çalışmada da nar kabuğu ile zenginleştirilmiş besiyerinde beslenen *T. molitor* larvalarının hacim değerlerinde %61.6'lık bir artış görülmüştür. (Gulsunoglu-Konuskan ve Dag, 2024). Başlangıçta her bir besiyerine ilave edilen 50 adet larvanın, 12 gün farklı besiyerlerinde beslenmeleri sonrası canlılık oranı kontrol besiyerinde beslenen larvalarda %96.7 iken, EMB besiyerinde beslenen larvalarda %99.3 olarak bulunmuştur. Bu durumda elma kabuğu ile zenginleştirilmiş besiyerinde larvaların canlı kalma oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmediği sonucuna ulaşılmıştır ( $P > 0.05$ ).

Çizelge 1. Kontrol ve EMB besiyerinde beslenen *T. molitor* larvalarının büyüme performansları

Table 1. Growth performance of *T. molitor* larvae fed on control and EMB diet

Süre Days	Ağırlık kazanımı (mg) <i>Larval weight (mg)</i>		Hacim (mm <sup>3</sup> ) <i>Volume (mm<sup>3</sup>)</i>		Canlılık oranı (%) <i>Survival rate (%)</i>	
	Kontrol* Control	EMB EMB	Kontrol* Control	EMB EMB	Kontrol* Control	EMB EMB
0. gün Day 0	5.6±0.3 <sup>B,a</sup>	5.6±0.3 <sup>B,a</sup>	27.7±9.8 <sup>B,a</sup>	27.7±9.8 <sup>C,a</sup>	100.0±0.0 <sup>A,a</sup>	100.0±0.0 <sup>A,a</sup>
4. gün Day 4	6.4±1.0 <sup>B,a</sup>	6.5±1.0 <sup>B,a</sup>	30.6±11.6 <sup>B,b</sup>	40.5±12.8 <sup>B,a</sup>	98.0±2.0 <sup>A,a</sup>	100.0±0.0 <sup>A,a</sup>
8. gün Day 8	7.8±0.6 <sup>AB,a</sup>	7.0±0.9 <sup>AB,a</sup>	32.3±11.2 <sup>B,b</sup>	39.3±9.6 <sup>B,a</sup>	98.0±3.5 <sup>A,a</sup>	98.7±0.6 <sup>A,a</sup>
12. gün Day 12	8.9±1.5 <sup>A,a</sup>	9.1±1.0 <sup>A,a</sup>	38.4±11.8 <sup>A,b</sup>	48.3±11.5 <sup>A,a</sup>	96.7±3.1 <sup>A,a</sup>	99.3±0.6 <sup>A,a</sup>

\* Veriler daha önceki makalemizde yayınlanmıştır (Gulsunoglu-Konuskan ve Dag, 2024) (karşılaştırma yapabilmek için Çizelge 1'de tekrar verilmiştir). †Ortalama değer±standart sapma. Aynı sütunda farklı büyük harfle (A> B> C) gösterilen ortalamalar fermantasyon süresince görülen anlamlı farklılığı ifade etmektedir ( $P < 0.05$ ). Aynı satırda farklı küçük harfle (a> b> c) gösterilen ortalamalar ise farklı gruplar arasında aynı gün içerisinde görülen anlamlı farklılığı ifade etmektedir ( $P < 0.05$ ).

\* Data were published in our previous study (Gulsunoglu-Konuskan ve Dag, 2024) (only stated in Table 1 for the comparison).

† Means±standard deviation. Means marked with different uppercase letters (A> B> C) within the same column indicate significant differences between days ( $P < 0.05$ ). Means marked with different lowercase letters (a> b> c) within the rows indicate significant differences between different diets ( $P < 0.05$ ).

Literatürde yapılan çalışmalar, çeşitli diyet modellerinin uygulanmasının böceklerde ağırlık kazanımını etkilediğini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada prina ve buğday ile beslenen *T. molitor* larvalarının büyüme performansında artış sağlandığı görülmüştür (Ruschioni vd., 2020). Tan vd. (2018) yaptığı bir çalışmada ise, *T. molitor* larvalarının canlılık oranı muz kabukları (%97.5)

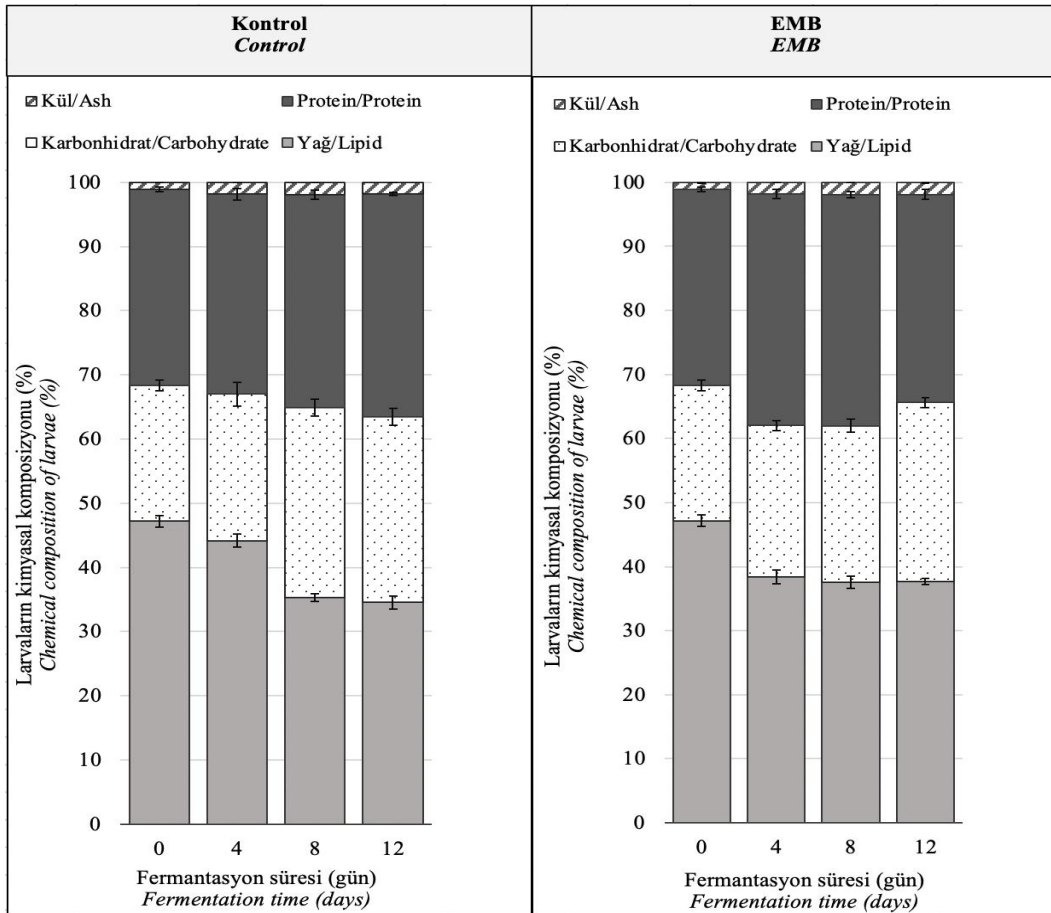
ile beslenen larvalarda en yüksek oranda bulunurken, bunu sırasıyla karpuz kabuğu (%95.0), karpuz kabuğu+muz kabuğu+yumurta kabuğu karışımı (%94.6), beyaz ekmek (kontrol grubu, %90.4) ve yumurta kabuğunun (%86.4) izlediğini rapor etmişlerdir. *T. molitor* larvaları yüksek diyet lif içeriğine sahip besiyerlerinde beslendiklerinde büyüme performansları daha iyi

olmaktadır (Tan vd., 2018). Başka bir çalışmada ise zeytin posası ile zenginleştirilmiş besiyerinde beslenen larvaların büyüme performanslarının, canlılık oranlarının ve ağırlık kazanımlarının arttığı belirtilmiştir (Ruschioni vd., 2020). Oonincx vd. (2015) ise besiyerine eklenen havuçların larvaların gelişme sürelerini ve ölüm oranlarını azalttığını rapor etmişlerdir.

### Larvaların Kimyasal Kompozisyonu

Şekil 1’de kontrol ve EMB besiyerinde beslenen larvaların fermantasyon süresince kimyasal kompozisyonunda meydana gelen değişim verilmiştir. Larvaların başlangıçtaki nem miktarı %69.5 iken, EMB besiyerinde beslenen larvalarda 12. gün sonunda nem miktarı %47.4’e düşmüş, kontrol besiyerinde beslenen larvalarda ise

%50.5’e düşmüştür. *T. molitor* larvalarının düşük nem içeriğine sahip organik atıklarda bile gelişim gösterebildiği bilinmektedir (Van Huis, 2013). Larvaların başlangıç kimyasal kompozisyonu kuru madde cinsinden %47.17 yağ, %30.59 protein, %1.09 kül ve %21.15 karbohidrat olarak bulunmuş ve kontrol besiyerinde beslenen larvaların kimyasal kompozisyonu 12. gün sonunda kuru madde cinsinden %34.54 yağ, %34.78 protein, %1.81 kül ve %28.87 karbohidrat olarak değişim göstermiştir (Gulsunoglu-Konuskan ve Dag, 2024). EMB besiyerinde beslenen larvaların kimyasal kompozisyonu ise 12. gün sonunda kuru madde cinsinden %37.67 yağ, %32.51 protein, %1.87 kül ve %27.95 karbohidrat olarak belirlenmiştir.



Şekil 1. Kontrol (sol) ve EMB (sağ) besiyerinde beslenen larvaların kimyasal kompozisyonları.

Figure 1. Chemical composition of larvae fed on control (left) and EMB (right) diets

Kontrol ve EMB besiyerinde beslenen larvaların yağ içeriği başlangıçta  $47.17 \pm 0.93$  iken 12 gün fermantasyon sonunda sırasıyla  $34.54 \pm 0.61$  ve  $37.67 \pm 0.47$ 'ye düşmüştür. Larvalardaki yağ miktarı diyetten gelmekte veya onlar tarafından sentezlenmekte olup vücutta depolanır, parçalanır, işlenir ve daha sonra kullanım yerine taşınır. Yüksek enerji ihtiyacı olduğu dönemlerde ise enerji deposu görevi görmektedir (Jantzen da Silva Lucas vd., 2020). Larvalardaki yağ miktarındaki bu azalmanın enerji dönüşümü için kullanıldığı düşünülmektedir. Literatürde, larvaların yağ içeriğinin kullanılan besiyeri bileşiminden etkilendiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada bitki atıkları ile beslenen *T. molitor* larvalarının, kontrol grubuna oranla daha düşük yağ içeriğine sahip olduğu belirtilmiştir (Li vd., 2013). Oonincx vd. (2015) yaptığı bir çalışmada referans besiyeri ile beslenen *T. molitor* larvalarının toplam yağ içeriği farklı oranlarda yağ ve proteinlerle zenginleştirilmiş besiyerinde beslenen larvalara kıyasla daha yüksek bulunmuş ve zenginleştirilmiş besiyerinde beslenen larvaların yağ içeriklerinin geniş bir aralıkta değiştiğini rapor etmişlerdir.

Protein miktarlarındaki değişim incelendiğinde, kontrol besiyerinde beslenen larvaların protein içerikleri  $30.59 \pm 0.33$ 'den 12. gün sonunda  $34.78 \pm 0.24$ 'e yükselmiştir. EMB besiyerinde beslenen larvaların protein içeriği ise  $30.59 \pm 0.33$ 'den 12. gün sonunda  $32.51 \pm 0.75$ 'e yükselmiştir. Kontrol besiyerinde beslenen larvaların protein içerikleri 12 gün sonunda, EMB besiyerinde beslenen larvalara kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Literatürde bulunan çalışmalarda da *T. molitor* larvalarının protein içeriğinde kullanılan besiyerine göre farklı sonuçlar elde edilmiştir. Rovai vd. (2021) havuç posası ile zenginleştirilmiş buğday kepeği ile beslenen *T. molitor* larvalarının protein içeriğinde azalma gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada ise keçiyoynuzu unu ile beslenen *T. molitor* larvalarının protein içeriğinde artış görülmüştür (Antonopoulou vd., 2022). Kröncke ve Benning (2023)'de bezelye ve pirinç proteini takviyesiyle

beslenen *T. molitor* larvalarında daha yüksek protein verimi rapor ederken, larvaların patates gevreği, tatlı lupin unu ve manyok unu ile beslendiğinde ise daha düşük protein içeriği rapor edilmiştir. Bu durumda, besiyerinin içerdiği protein miktarı ile larvaların vücutlarında depoladığı protein miktarı arasında bir ilişkili olduğu sonucuna ulaşılabilmektedir.

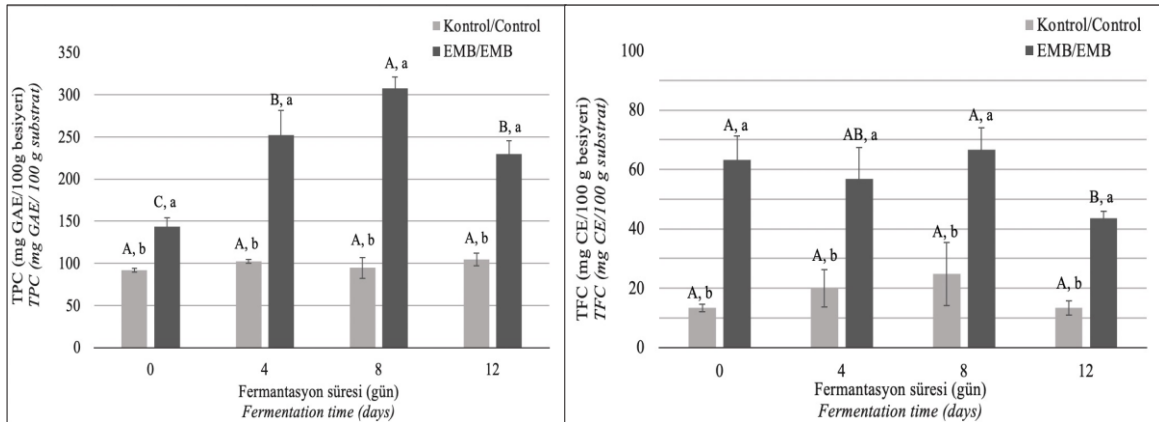
Larvaların kül miktarları  $1.09 \pm 0.03$ 'den kontrol ve EMB besiyerinde beslenen larvalar için 12 gün sonunda sırasıyla  $1.81 \pm 0.09$ 'a ve  $1.87 \pm 0.1$ 'e artış göstermiş ve görülen bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Ancak, kontrol ve EMB besiyerlerinde beslenen larvalar kıyaslandığında elma kabuğu ilavesinin larvaların kül içeriğinde anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı görülmüştür. Harsanyi vd. (2020) yapmış olduğu bir çalışmada, sebze atıkları ve bahçe atıkları ile beslenen *T. molitor* larvalarının kül içeriği kontrol grubuna (tavuk yemi) oranla daha yüksek bulunmuştur. Mancini vd. (2019) *T. molitor* larvalarını ekmek, kurabiye ve her ikisinin 1:1 kombinasyonu ile beslemişler ve larvaların kül miktarlarını sırasıyla  $1.88$ ,  $0.70$  ve  $1.29$  bulmuşlardır. Bu durum larvaların gelişimi için kullanılan besiyerinin yüksek kül içeriğine sahip olmaları ile açıklanabilir.

Karbohidrat miktarına bakıldığında, larvaların başlangıç içeriği  $21.15 \pm 0.82$  iken kontrol ve EMB besiyerinde beslenen larvalarda 12. gün sonunda sırasıyla  $28.88 \pm 1.32$  ve  $27.95 \pm 0.80$ 'e yükselmiş ve bu artış her iki grup için de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Ancak, kontrol ve EMB besiyerleri kıyaslandığında elma kabuğu ilavesinin larvaların karbohidrat içeriğinde anlamlı bir değişime sebep olmadığı görülmüştür. Larvaların fermantasyon sonuna doğru karbohidrat miktarında görülen artış, büyüme ile birlikte kitin tabakasında meydana gelen artış ile açıklanabilir (Zhang vd., 2019).

### Larval Fermantasyon Sonrası Besiyerinin TPC ve TFC Miktarı

Larval fermantasyon sonrası kontrol ve EMB besiyerinin TPC miktarındaki değişim incelenmiş ve sonuçlar Şekil 2'de verilmiştir. Kontrol besiyerinin TPC miktarı başlangıçta 91.97 mg GAE/100 g iken 12. gün sonunda bu değer 104.79 mg GAE/100 g'a yükselmiştir (Gulsunoglu-Konuskan ve Dag, 2024). Ancak, kontrol besiyerinin TPC miktarı larval fermantasyon süresince istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermemiştir ( $P > 0.05$ ). EMB besiyerinin TPC miktarı başlangıçta 143.94 mg GAE/100 g'dan 8. gün sonunda maksimum değerine (307.56 mg GAE/100 g) yükselmiş, 12. günde ise bir miktar düşmüştür ( $P < 0.05$ ). Kontrol besiyerinin EMB besiyerine kıyasla daha yüksek TPC miktarına sahip olması fenolik

maddeler açısından zengin olan elma kabuğu ile zenginleştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Literatürde elma kabuğunda bulunan fenolik madde miktarının %88'inin hücre duvarı bileşenlerine (pektin, selüloz, lignin, hemiselüloz) bağlı formda bulunduğu rapor edilmiştir (Gulsunoglu vd., 2019). Bağlı formda bulunan fenolik bileşikler alkali, asit veya fermantasyon uygulamaları ile serbest hale geçebilmektedir. Bu çalışmada da larval fermantasyon sonrası EMB besiyerinde TPC miktarının artması larvaların sahip olduğu ekstraselüler enzim sistemleri ve bağırsak mikrobiyotası sebebiyle elma kabuklarının selülozik yapısının parçalanması ve bağlı fenoliklerin salınması şeklinde açıklanabilir (Willis vd., 2010).



Şekil 2. Larval fermantasyon sonrası kontrol (gri) ve EMB (siyah) besiyerlerinin TPC (sol) ve TFC (sağ) miktarlarındaki değişim. Aynı grupta farklı büyük harflerle (A > B > C) gösterilen ortalamalar fermantasyon süresince görülen anlamlı farklılığı ifade ederken, aynı günde farklı küçük harflerle (a > b > c) gösterilen ortalamalar ise farklı gruplar arasında aynı gün içerisinde görülen anlamlı farklılığı ifade etmektedir ( $P < 0.05$ ).

Figure 2. The difference in TPC (left) and TFC (right) of control (gray) and EMB (black) spent feed after larval fermentation. While the means shown with different uppercase letters (A > B > C) within the same groups indicate the significant difference during larval fermentation, the means shown with different lowercase letters (a > b > c) on the same day indicate the significant difference between different groups on the same day ( $P < 0.05$ ).

Flavonoidler fenolik bileşiklerin bir alt grubudur ve bitkilerde en çok bulunan ikincil metabolit ürünleridir (Mutha vd., 2021). Elma kabuğunda yüksek miktarda flavonoid grubu fenoliklerden kuersetin ve türevleri bulunur (Gulsunoglu vd.,

2019). Bu sebeple flavonoid madde miktarının belirlenmesi önemlidir. EMB besiyerinin TFC miktarı başlangıç (63.25 mg CE/100 g) değeri ile 4. ve 8. günde anlamlı bir değişim görülmezken ( $P > 0.05$ ), 12. gün sonunda 43.61 mg CE/100 g'a

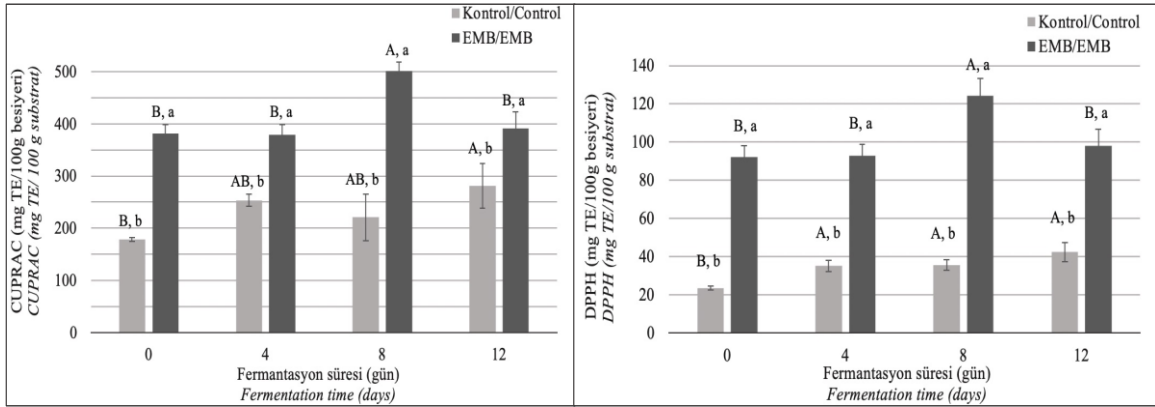


düşmüştür ( $P < 0.05$ ). Kontrol besiyerinin başlangıç TFC miktarı 13.35 mg CE/100 g iken larval fermantasyon sonrası TFC miktarı gün bazında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $P > 0.05$ ) (Gulsunoglu-Konuskan ve Dag, 2024).

### Larval Fermantasyon Sonrası Besiyerinin Antioksidan Aktivite Analizi

Kontrol ve EMB besiyerinin larval fermantasyon sonrası antioksidan aktivite sonuçları Şekil 3'de verilmiştir. Larval fermantasyon sonucu kontrol besiyerinin DPPH radikal süpürme aktivitesi başlangıçta 23.37 mg TE/100 g iken 12. gün sonunda 42.26 mg TE/100 g'a istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ( $P < 0.05$ ). EMB besiyerinin başlangıç DPPH aktivitesi 92.19 mg TE/100 g iken 8. gün sonunda 124.16 mg TE/100 g'a istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarak maksimum seviyesine ulaşmıştır ( $P < 0.05$ ). CUPRAC antioksidan aktivite sonuçlarına göre, kontrol besiyerinin başlangıç CUPRAC antioksidan aktivitesi 178.14 mg TE/100 g iken 12. gün sonunda anlamlı bir şekilde artarak

maksimum seviyesine (281.50 mg TE/100 g) ulaşmıştır. Larval fermantasyon sonrası EMB besiyerinde maksimum CUPRAC antioksidan aktivitesi 8. günde (501.45 mg TE/100 g) görülürken diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ( $P > 0.05$ ). Elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, DPPH ve CUPRAC antioksidan aktiviteleri arasında pozitif yönlü güçlü bir ilişki bulunmakta iken kontrol besiyerinde ( $R^2=0.9424$ ) elde edilen Pearson korelasyon katsayısı EMB besiyerinde ( $R^2=0.9959$ ) elde edilene kıyasla daha düşük bulunmuştur. EMB besiyerinin her iki antioksidan aktivite değeri en yüksek 8. günde görülmüştür. Görülen bu artışın, besiyerinin TPC miktarındaki artış ile pozitif yönlü anlamlı bir ilişki içinde olduğu yapılan Pearson korelasyon testi ile tespit edilmiştir. Buna göre, larval fermantasyon sonrası EMB besiyerinin TPC değerleri ile CUPRAC ve DPPH antioksidan aktivite sonuçları arasında da Pearson korelasyon katsayıları sırasıyla 0.7322 ve 0.7638 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3. Larval fermantasyon sonrası kontrol (gri) ve EMB (siyah) besiyerlerinin CUPRAC (sol) ve DPPH (sağ) antioksidan aktivite miktarlarındaki değişim. Aynı grupta farklı büyük harflerle (A > B > C) gösterilen ortalamalar fermantasyon süresince görülen anlamlı farklılığı ifade ederken, aynı günde farklı küçük harflerle (a > b > c) gösterilen ortalamalar ise farklı gruplar arasında aynı gün içerisinde görülen anlamlı farklılığı ifade etmektedir ( $P < 0.05$ ).

Figure 3. The difference in CUPRAC (left) and DPPH (right) antioxidant activity of control (gray) and EMB (black) spent feed after larval fermentation. While the means shown with different uppercase letters (A > B > C) within the same groups indicate the significant difference during larval fermentation, the means shown with different lowercase letters (a > b > c) on the same day indicate the significant difference between different groups on the same day ( $P < 0.05$ ).

*T. molitor* larvalarının meyve-sebze atıkları ile beslenmesi sonrası hem insan gıdası hem de hayvan yemi olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Ayrıca, *T. molitor* larvaları besiyeri ortamına etki ederek besiyerinin fenolik bileşenleri gibi biyoaktif madde içeriğini de değiştirebilmektedir. Bu çalışmada da elma kabuklarının larval fermantasyon sonrası fenolik madde ve antioksidan aktivite değerlerinde başlangıca kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu durum, hem atıklarla beslenen larvaların gelişimlerinde maliyetin düşürülmesini hem de atıkların larval fermantasyon sonrası biyoaktif madde kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

### Larval Fermantasyon Sonrası EMB Besiyerinin Fenolik Profil Analizi

EMB besiyerinin fenolik profili ve fenolik madde konsantrasyonları UPLC-ESI-QqQ-MS/MS ve HPLC cihazlarında incelenmiş ve toplam 4 adet kuersetin türevi (kuersetin türevi 1, 2, 3 ve 4) tespit edilmiştir. Fenolik maddelerin tanımlamaları UPLC-ESI-QqQ-MS/MS cihazından elde edilen m/z değerleri ve HPLC

cihazından elde edilen UV-VIS spektrumunda standartlardan elde edilen maksimum absorbands değerleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır (Çizelge 2). Kuersetin türevi 1 (KT1) 255.7 ve 348.6 nm'de UV-VIS spektrum vermiş ve m/z değerleri kuersetin-3-rutinozit standardı ile eşleşmiştir. Kuersetin türevi 2 (KT2) ve kuersetin türevi 3 (KT3) HPLC'de aynı maksimum absorbandsları (255.7 ve 355.8 nm) verirken farklı alıkonma zamanlarında pikler oluşturmuş ve m/z değerleri ise sırasıyla kuersetin-3-O-glukozit ve kuersetin-3-O-galaktozit standardı ile eşleşmiştir. Kuersetin türevi 4 (KT4) ise UV-VIS spektrumunda 254.5 ve 348.6 nm'de maksimum absorbands göstermiş ve m/z değerleri kuersitrin standardı ile uyumlu bulunmuştur. Kuersetin türevlerinin elma kabuğundaki varlığı yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir. Gulsunoglu vd. (2020) yapmış oldukları bir çalışmada elma kabuğunda kuersetin-3-O-galaktozit, kuersetin-3-O-glukozit, kuersetin-3-O-rhamnozit varlığını rapor etmişlerdir. Ayrıca Xia vd. (2024) yaptığı bir çalışmada da elma kabuğu ekstraktlarında kuersitrin tespit etmiştir.

Çizelge 2. Larval fermantasyon sonrası EMB besiyerinde tespit edilen fenolik bileşikler  
Table 2. Phenolic compounds identified in EMB spent feed after larval fermentation

	R <sub>t</sub> (dk) R <sub>t</sub> (min)	λ <sub>max</sub> (nm) λ <sub>max</sub> (nm)	Ana ion Mother ion	Fragmentler Fragments	Tanımlanan Fenolikler Identified Phenolics
KT 1	4.33	255.7; 348.6	611.3	303.1	Kuersetin-3-rutinozit* <i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>
KT 2	4.64	255.7; 355.8	463.2	300.1	Kuersetin-3-O-glukozit* <i>Quercetin-3-O-glucoside</i>
KT 3	4.68	255.7; 355.8	463.3	300.2	Kuersetin-3-O-galaktozit* <i>Quercetin-3-O-galactoside</i>
KT 4	5.26	254.5; 348.6	447.2	301.1	Kuersitrin* <i>Quercitrin</i>

\*Standart kullanılarak tanımlanmıştır.

\*Confirmed with standards.

Çizelge 3'de larval fermantasyon sonrası EMB besiyerinin fenolik profilinde meydana gelen değişimin sonuçları verilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kuersetin-3-rutinozit diğer kuersetin türevleri içinde en yüksek konsantrasyona sahip olmaktadır. Kuersetin-3-

rutinozit, 4. ve 8. günlerde başlangıca göre bir düşüş gösterirken 12. günde tekrar başlangıç seviyesine yükselmiştir. Kuersetin-3-O-glukozit ise larval fermantasyonun 8. gününde en yüksek seviyesine ulaşırken 12. günde tekrar bir düşüş göstermiştir. Kuersitrin fermantasyonun 4. ve 8.

günlerinde en yüksek seviyesine ulaşırken 12. günde tekrar başlangıç seviyesine geri dönmüştür. Kuersetin-3-O-galaktozid ise fermantasyon süresince istatistiksel olarak anlamlı bir değişim göstermemiştir ( $P > 0.05$ ). Fenolik bileşiklerin larval fermantasyon sonrası konsantrasyonlarında meydana gelen değişim kuersetin türevlerinin biyodönüşüme uğraması ile açıklanabilir. Fenolik bileşiklerin biyodönüşüm yolu ile farklılaşmaları

Faz I ve Faz II reaksiyonları vasıtasıyla gerçekleşir ve bu reaksiyonlarda özellikle enzimler büyük rol oynar (Gulsunoglu-Konuskan vd., 2022). *T. molitor* larvaları ihtiyaç duydukları besini elde etmek için sahip oldukları enzim sistemlerini ve mikrobiyotalarını kullanarak besiyerinin fenolik içeriğinde değişime sebep olmuş olabilir.

Çizelge 3. Larval fermantasyon sonrası EMB besiyerinin fenolik profilindeki değişim

Table 3. The difference in phenolic profile of EMB spent feed after larval fermentation

Fenolik bileşik <i>Phenolic compound</i>	Konsantrasyon ( $\mu\text{g/g km}$ )* <i>Concentration (<math>\mu\text{g/g dm}</math>)</i>			
	0. gün <i>Day 0</i>	4. gün <i>Day 4</i>	8. gün <i>Day 8</i>	12. gün <i>Day 12</i>
Kuersetin-3-rutinozid <i>Quercetin-3-O-rutinoside</i>	81.1 $\pm$ 1.4 <sup>A</sup>	38.7 $\pm$ 10.7 <sup>B</sup>	43.6 $\pm$ 0.6 <sup>B</sup>	70.1 $\pm$ 3.4 <sup>A</sup>
Kuersetin-3-O-glukozit <i>Quercetin-3-O-glucoside</i>	29.7 $\pm$ 0.6 <sup>B</sup>	32.0 $\pm$ 3.0 <sup>B</sup>	40.0 $\pm$ 0.8 <sup>A</sup>	27.2 $\pm$ 1.3 <sup>B</sup>
Kuersetin-3-O-galaktozid <i>Quercetin-3-O-galactoside</i>	38.3 $\pm$ 1.6 <sup>A</sup>	33.8 $\pm$ 9.5 <sup>A</sup>	32.9 $\pm$ 14.1 <sup>A</sup>	35.8 $\pm$ 2.7 <sup>A</sup>
Kuersitrin <i>Quercitrin</i>	46.4 $\pm$ 1.5 <sup>B</sup>	57.8 $\pm$ 3.3 <sup>A</sup>	56.4 $\pm$ 2.3 <sup>A</sup>	47.2 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>

\*Ortalama değer $\pm$ standart sapma. Her satırda verilen farklı büyük harfler (A> B> C), günler arasındaki anlamlı farklılığı ifade etmektedir ( $P < 0.05$ ).

\*Means $\pm$ standard deviation. Means marked with different uppercase letters (A> B> C) within the same rows indicate significant differences between days ( $P < 0.05$ ).

## SONUÇ

Sonuç olarak, elma kabuğu ile zenginleştirilmiş besiyerinde *T. molitor* larvalarının yaşamsal faaliyetleri kontrol grubuyla kıyaslandığında hacim değerleri EMB besiyerinde daha yüksek bulunurken, ağırlık kazanımı ve canlılık oranlarında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. EMB besiyeri ile beslenen larvaların 8. günde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek protein ve daha düşük karbohidrat değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Larval fermantasyon sonrası 8. günde EMB besiyerinin antioksidan aktivitesinde ve TPC miktarında anlamlı bir artış görülmüştür. Bu durum larval fermantasyon ile besiyerinin fenolik madde içeriğinin değiştirilebileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca, bu bulgular ile hem larva gelişiminin desteklenmesi hem de fenolik madde miktarının arttırılması

yoluyla gıda atıklarının katma değerinin yükseltilmesi, çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamalar için fayda sağlayacaktır. Ancak, hem larvaların hem de larval fermantasyon sonrası besiyerinin gıda ve yem olarak kullanılabilmesi için öncelikle toksikolojik ve mikrobiyolojik değerlendirmelerinin yapılması, insan ve hayvan sağlığı için herhangi bir sorun teşkil etmeyeceğinin kanıtlanması gerekmektedir.

## ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## YAZAR KATKISI

Sedanur Demirbaş Yıldız: Analizlerin yapılması, makale taslağının oluşturulması, Zehra Gülsünoğlu-Konuşkan: Analizlerin yapılması,

makale yazımı, sonuçların değerlendirilmesi, süreç yönetimi.

#### KAYNAKLAR

Andreadis, S. S., Panteli, N., Mastoraki, M., Rizou, E., Stefanou, V., Tzentilasvili, S., Sarrou, E., Chatzifotis, S., Krigas, N., Antonopoulou, E. (2022). Towards functional insect feeds: Agri-food by-products enriched with post-distillation residues of medicinal aromatic plants in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) breeding. *Antioxidants*, 11(1). doi: 10.3390/antiox11010068

Antonopoulou, E., Panteli, N., Feidantsis, K., Mastoraki, M., Koutsogeorgiou, E. I., Grivaki, E., Papagrigoiriou, T., Christias, S. P., Chatzifotis, S., Lazari, D., Andreadis, S. S., Krigas, N. (2022). Carob (*Ceratonia siliqua*) as functional feed is beneficial in yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) rearing: evidence from growth, antioxidant status and cellular responses. *Antioxidants*, 11(9). doi: 10.3390/antiox11091840

AOAC. (2000). *Official methods of analysis of the association of analytical chemists*. Arlington, Virginia, USA.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981. doi: <https://doi.org/10.1021/jf048741x>

Capanoglu E, Beekwilder J, Boyacioglu D, Hall R, de Vos R. (2008). Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 964–973.

Catalkaya, G., Guldiken, B., Capanoglu, E. (2022). Encapsulation of anthocyanin-rich extract from black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace by spray drying using different coating materials. *Food & Function*, 13(22), 11579–11591. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/fo/d2fo02569h>

Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0115589>

Dhillon, G. S., Kaur, S., Brar, S. K., Verma, M. (2012). Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*. 38, 6–13. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.12.036

FAOSTAT. (2024). *Crops and Livestock Products*. Retrieved from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Erişim tarihi: 16 Temmuz 2024).

Gullón, B., Yáñez, R., Alonso, J. L., Parajó, J. C. (2008). L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 99(2), 308-319. doi: 10.1016/j.biortech.2006.12.018

Gulsunoglu, Z., Aravind, S., Bai, Y., Wang, L., Kutcher, H. R., Tanaka, T. (2019). Deoxynivalenol (DON) accumulation and nutrient recovery in black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) fed wheat infected with fusarium spp. *Fermentation*, 5(3). doi: 10.3390/fermentation5030083

Gulsunoglu, Z., Purves, R., Karbancioglu-Guler, F., Kilic-Akyilmaz, M. (2020). Enhancement of phenolic antioxidants in industrial apple waste by fermentation with *Aspergillus* spp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101562

Gulsunoglu, Zehra, Karbancioglu-Guler, F., Raes, K., Kilic-Akyilmaz, M. (2019). Soluble and insoluble-bound phenolics and antioxidant activity of various industrial plant wastes. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1501–1510. doi: 10.1080/10942912.2019.1656233

Gulsunoglu-Konuskan, Z., Dag, S. (2024). Physicochemical properties and ellagic acid accumulation in *Tenebrio molitor* larvae fed with pomegranate peel-enriched media. *European Food*

- Research and Technology*, 250(5), 1473–1483. doi: 10.1007/s00217-024-04480-5
- Gulsunoglu-Konuskan, Z., Kilic-Akyilmaz, M. (2022). Microbial bioconversion of phenolic compounds in agro-industrial wastes: a review of mechanisms and effective factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(23), 6901–6910. doi: 10.1021/acs.jafc.1c06888
- Harsányi, E., Juhász, C., Kovács, E., Huzsvai, L., Pintér, R., Fekete, G., Varga, Z. I., Aleksza, L., Gyuricza, C. (2020). Evaluation of organic wastes as substrates for rearing *Zophobas morio*, *Tenebrio molitor*, and *Acheta domesticus* larvae as alternative feed supplements. *Insects*, 11(9), 604. doi: 10.3390/insects11090604
- Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Guerrero-Beltrán, J. A., Navarro-Cruz, A. R., Corona-Jiménez, E., Ochoa-Velasco, C. E. (2016). Optimization of antioxidant compounds extraction from fruit by-products: apple pomace, orange and banana peel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(1), 103–115. doi: 10.1111/jffpp.12588
- Janssen, R. H., Vincken, J. P., Van Den Broek, L. A. M., Fogliano, V., Lakemond, C. M. M. (2017). Nitrogen-to-protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2275–2278. doi: 10.1021/acs.jafc.7b00471
- Jantzen da Silva Lucas, A., Menegon de Oliveira, L., da Rocha, M., Prentice, C. (2020). Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry*, 311(December 2019), 126022. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126022
- Kröncke, N., Benning, R. (2023). Influence of dietary protein content on the nutritional composition of mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.). *Insects*, 14(3), 1–19. doi: 10.3390/insects14030261
- Lawal, K. G., Kavle, R. R., Akanbi, T. O., Miroso, M., Agyei, D. (2021). Enrichment in specific fatty acids profile of *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* larvae through feeding. *Future Foods*, 3(October 2020). doi: 10.1016/j.fufo.2021.100016
- Lees, G. L., Suttill, N. H., Wall, K. M., & Beveridge, T. H. (1995). Localization of condensed tannins in apple fruit peel, pulp, and seeds. *Canadian Journal of Botany*, 73(12), 1897–1904. Doi: https://doi.org/10.1139/b95-202
- Li, L., Zhao, Z., Liu, H. (2013). Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans. *Acta Astronautica*, 92(1), 103–109. doi: 10.1016/j.actaastro.2012.03.012
- Liu, C., Masri, J., Perez, V., Maya, C., Foods, J. Z. (2020). Growth performance and nutrient composition of mealworms (*Tenebrio molitor*) fed on fresh plant materials-supplemented diets. *Foods*, 9(151), 1–10. doi: 10.3390/foods9020151
- Madrera, R. R., Bedriñana, R. P., Valles, B. S. (2015). Production and characterization of aroma compounds from apple pomace by solid-state fermentation with selected yeasts. *LWT-Food Science and Technology*. doi: 10.1016/j.lwt.2015.07.056
- Mancini, S., Fratini, F., Turchi, B., Mattioli, S., Dal Bosco, A., Tuccinardi, T., Nozic, S., Paci, G. (2019). Former foodstuff products in *Tenebrio molitor* rearing: Effects on growth, chemical composition, microbiological load, and antioxidant status. *Animals*, 9(8), 1–13. doi: 10.3390/ani9080484
- Marks, S. C., Mullen, W., Crozier, A. (2007). Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.2778
- Mutha, R. E., Tatiya, A. U., Surana, S. J. (2021). Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 25. doi: 10.1186/s43094-020-00161-8
- Navarro del Hierro, J., Gutiérrez-Docio, A., Otero, P., Reglero, G., Martín, D. (2020). Characterization, antioxidant activity, and

- inhibitory effect on pancreatic lipase of extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor*. *Food Chemistry*, 309. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2019.125742
- Oonincx, D. G. A. B., Van Broekhoven, S., Van Huis, A., Van Loon, J. J. A. (2015). Feed conversion, survival and development, and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *PLOS ONE*, 10(12), e0144601. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0144601
- Rai, S., Wahile, A., Mukherjee, K., Saha, B. P., Mukherjee, P. K. (2006). Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(3), 322–327. doi: 10.1016/J.JEP.2005.09.025
- Rovai, D., Ortgies, M., Amin, S., Kuwahara, S., Schwartz, G., Lesniasuskas, R., Garza, J., Lammert, A. (2021). Utilization of carrot pomace to grow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Sustainability (Switzerland)*, 13(16). doi: 10.3390/su13169341
- Ruschioni, S., Loreto, N., Foligni, R., Mannozi, C., Raffaelli, N., Zamporlini, F., Pasquini, M., Roncolini, A., Cardinali, F., Osimani, A., Aquilanti, L., Isidoro, N., Riolo, P., Mozzon, M. (2020). Addition of olive pomace to feeding substrate affects growth performance and nutritional value of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) larvae. *Foods*, 9(3). doi: 10.3390/foods9030317
- 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. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1
- Tan, S. W., Lai, K. S., Loh, J. Y. (2018). Effects of food wastes on yellow mealworm *Tenebrio molitor* larval nutritional profiles and growth performances. *Examines in Marine Biology & Oceanography*, 2(1), 173–178. doi: 10.31031/eimbo.2018.02.000530
- Tang, Y., Debnath, T., Choi, E. J., Kim, Y. W., Ryu, J. P., Jang, S., Chung, S. U., Choi, Y. J., Kim, E. K. (2018). Changes in the amino acid profiles and free radical scavenging activities of *Tenebrio molitor* larvae following enzymatic hydrolysis. *PLoS ONE*, 13(5), 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0196218
- Van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 58, 563–583. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>.
- Willis, J. D., Oppert, C., Jurat-Fuentes, J. L. (2010). Methods for discovery and characterization of cellulolytic enzymes from insects. *Insect Science*, 17(3), 184–198. doi: 10.1111/j.1744-7917.2010.01322.x
- Xia, W., Song, B., Li, T., Liu, R. H. (2024). Phytochemical profiles, antioxidant activities, and synergistic antiproliferative effects of blueberry and apple peel extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 104(2), 737–745. doi: 10.1002/jsfa.12964
- Zhang, X., Tang, H., Chen, G., Qiao, L., Li, J., Liu, B., Liu, Z., Li, M., Liu, X. (2019). Growth performance and nutritional profile of mealworms reared on corn stover, soybean meal, and distillers' grains. *European Food Research and Technology*. 245, 2631–2640. doi: 10.1007/s00217-019-03336-7

# İçindekiler / Content

## Araştırmalar (İngilizce) / Researches (English)

- Bayaçlı, G., Patr. İ., Karkar, B., Şahin, S. (2024). Optimization of the synergistic antioxidant effect of selected phenolic compounds (gallic acid, rosmarinic acid and caffeic acid) and investigation of their ability to prevent formation of DNA base damage / Seçilmiş fenolik bileşiklerin (gallik asit, rosmarinik asit ve kafeik asit) sinerjistik antioksidan etkisinin optimizasyonu ve DNA baz hasarı oluşumunu önleme yeteneklerinin araştırılması.....777-790
- Eminoğlu, G. (2024). The impact of starter cultures on quark type cheese production / Starter kültürlerin quark tipi peynir üretimine etkisi.....791-804
- Huseynov, S., Tarlak, F. (2024). Developing menu planning software using optimization and artificial intelligence algorithm / Optimizasyon ve yapay zekâ algoritmaları kullanarak menü planlama yazılımı geliştirilmesi.....833-846
- Ünal, N., Süslü, A., Külcü, R., Dincer, C., Yavuzlar, İmurgü E. E., Ertekin, C. (2024). Convective drying of chokeberry cv. "vikings" and modeling of drying kinetics / Aronyanın konvektif kurutulması ve kurutma kinetiğinin modellenmesi.....847-862
- Karabulut, G. (2024). Techno-functional properties of chickpea protein isolate-treated acidic and basic pH-cycling / Asidik ve bazik pH-değıştirme uygulanmış nohut proteinlerinin teknofonksiyonel özellikleri.....879-890
- Rayman Ergün, A. (2024). Investigation of conventional and microwave combined roasting effect on the physicochemical, textural and sensory properties of sunflower seed / Ayçekirdeğinin fizikokimyasal, tekstürel ve duyuşsal özellikleri üzerine konvansiyonel ve mikrodalga kombine kavurma etkisinin incelenmesi.....891-902
- Poyraz Ekinci, F., Kökyar, N., Sener, D. (2024) Investigation of the effect of enzyme application on the structure of wafers in the food industry / Enzim uygulamasının gıda endüstrisinde gofreterin yapısı üzerindeki etkisinin incelenmesi .....946-959
- Yasar, D., Kose, S. (2024). The effect of packaging methods and storage temperatures on the antioxidant and antimicrobial activities of Malatya cheese / Ambalajlama yöntemleri ve depolama sıcaklıklarının Malatya peynirinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelere etkisi.....960-967

## Araştırmalar (Türkçe) / Researches (Turkish)

- Bacı Torun, F. (2024). Nar suyunun aljinat kürecikleri ile enkapsülasyonu: İşlem koşullarının optimizasyonu / Encapsulation of pomegranate juice using alginate beads: Optimization of processing conditions.....805-819
- Özkara, A. (2024). Afyonkarahisar ilinde yerel marketlerden toplanan *Corylus avellana* (fındık) örneklerinden fungus izolasyonu, aflatoksin ve okratoksin miktarının belirlenmesi / Fungus isolation, determination of aflatoxin and ochratoxin A from *Corylus avellana* (hazelnut) samples collected from local markets in Afyonkarahisar province.....820-832
- Karakuş, M. Ş. (2024). Bakla proteini: Mikrodalga destekli özütleme koşullarının optimizasyonu ve karakteristik özelliklerinin peyniraltı suyu proteini ile karşılaştırılması/ Faba bean protein: Optimization of microwave-assisted extraction conditions and comparison of its characteristics with whey protein.....863-878
- Kaynarca, G. B. (2024). Bezelye proteini ve spirulina ilavesinin ikili hidrojel formlarının reolojik özellikleri üzerine etkisi / The effect of pea protein and spirulina addition on the rheological properties of binary hydrogel forms.....903-919
- Karaoğlan H. A. (2024). Yeşil sarımsak (*Allium sativum* L.) yapraklarında bulunan fenolik ve antioksidan maddelerin ekstraksiyon koşullarının yüzey yanıt yöntemi ile optimizasyonu / Optimization of phenolic and antioxidant compounds extraction conditions in green garlic (*Allium sativum* L.) leaves by surface response methodology.....920-933
- Kutlu, N., Hacıbektaşoğlu, H. (2024). Derin ötektik çözücülerin portakal kabuğundan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonuna etkisi / Effect of deep eutectic solvents on extraction of bioactive compounds from orange peel.....934-945
- Akan, E., Yıldız Akgül, F., Karaman, A. D. (2024). Aydın ilinde satılan çörek otlı Çökelek peynirlerinin genel bileşimi, yağ asidi ve uçucu bileşen kompozisyonu / General composition, fatty acid and volatile component composition of Çökelek cheese with black cumin sold in Aydın province.....968-980
- Demirbaş Yıldız, S., Gülsünöğlü Konuşkan, Z. (2024). Elma kabuğuyla beslenen *Tenebrio molitor* larvalarının fizikokimyasal özellikleri ve larval fermantasyonun elma kabuğunun fenolik profiline etkisi / Physicochemical properties of *Tenebrio molitor* larvae feeding on apple peel and the effect of larval fermentation on the phenolic profile of apple peel.....981-995