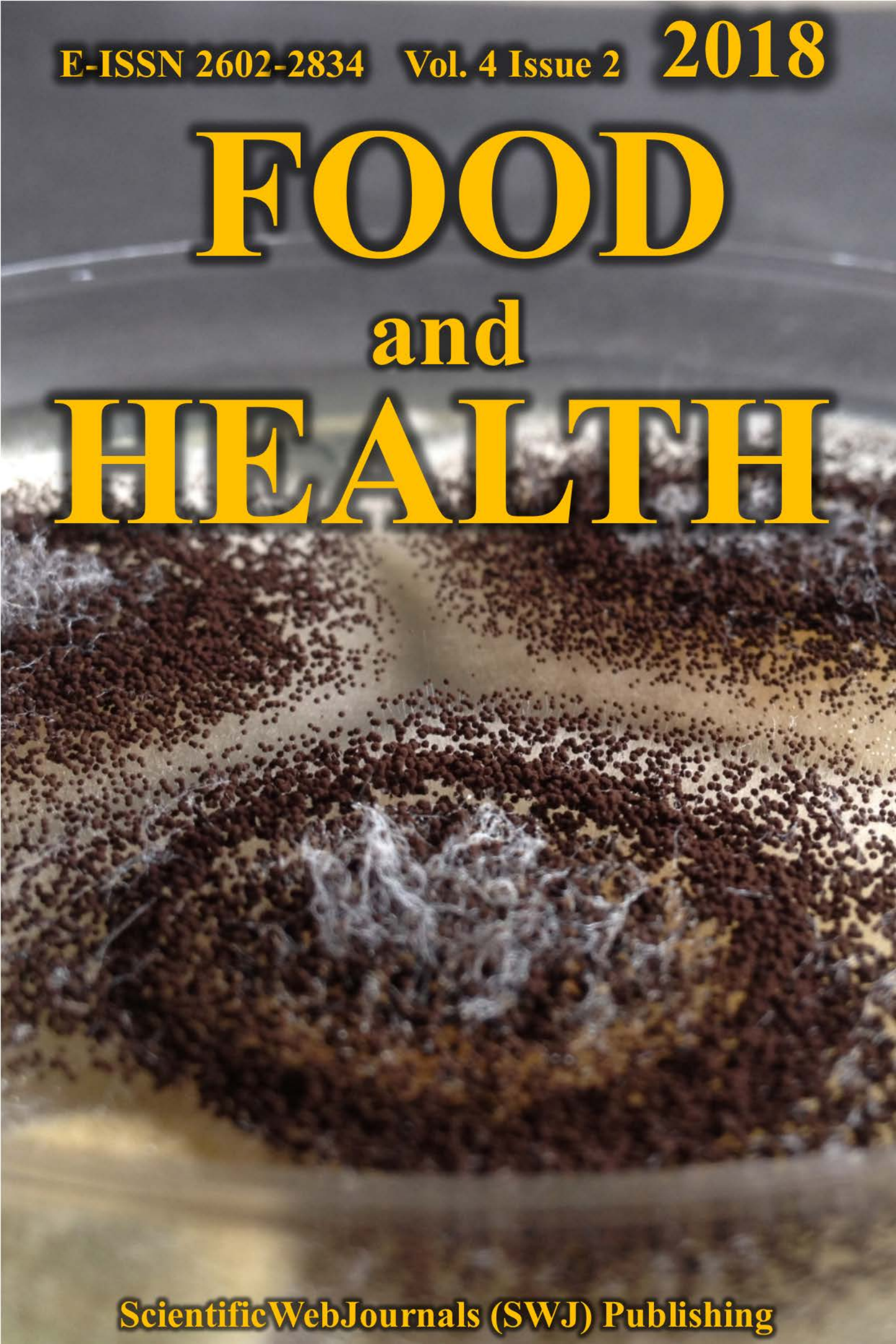


E-ISSN 2602-2834

Vol. 4 Issue 2

2018

FOOD and HEALTH



ScientificWebJournals (SWJ) Publishing



FOOD and HEALTH

Abbreviation: **FOOD HEALTH**

e-ISSN: **2602-2834**

journal published in one volume of four issues per year by

www.ScientificWebJournals.com

Contact e-mail: jfhs@scientificwebjournals.com and ozkanozden@scientificwebjournals.com

Aims and Scope

“Food and Health” journal will publish peer-reviewed (double blind) articles covering all aspects of **food science and their health effect** in the form of original research articles (full papers and short communications), and review articles. Their team of experts provides editorial excellence, fast publication processes and high visibility for your paper.

Food/Seafood/Food Technology/Food Chemistry/Food Microbiology/Food Quality/Food Safety/Food Contaminant/Food Allergen/Food Packaging/Modified Food/Functional Food/Dietary Supplements/Nutrition and their health effect is the general topics of journal.

Manuscripts submitted to "Food and Health" journal will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal. Our journal will be published quarterly in English or Turkish language. “Food and Health” journal will not charge article submission or processing fees.

Cover Photo:

Prof. Dr. Fulya TURANTAŞ (fturantas@gmail.com)

Ege University, EMYO, Department of Food Technology, Turkey

© 2018 ScientificWebJournals (SWJ)

All rights reserved/Bütün hakları saklıdır.

Chief Editor:

Prof. Dr. Nuray ERKAN (nurerkan@istanbul.edu.tr)

Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Turkey

Co Editor in Chief:

Prof. Dr. Özkan ÖZDEN (ozden@istanbul.edu.tr)

Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Turkey

Editorial Board:

Prof. Dr. Ali AYDIN (aliaydin@istanbul.edu.tr)

University of Istanbul, Faculty of Veterinary Medicine,
Food Hygiene and Technology Department, Turkey

Prof. Dr. Bhesh BHANDARI (b.bhandari@uq.edu.au)

University of Queensland, Faculty of Science, Australia

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR (icakir55@gmail.com)

University of Abant İzzet Baysal, Faculty of Engineering and Architecture,
Department of Food Engineering, Turkey

Prof. Dr. Cem ÇETİN (sporhekimi@gmail.com)

Süleyman Demirel University, Faculty of Medicine, Turkey

Prof. Dr. Frerk FELDHUSEN (Frerk.Feldhusen@lallf.mvnet.de)

Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Rostock, Germany

Prof. Dr. Carsten HARMS (charms@hs-bremerhaven.de)

Applied Univ. Bremerhaven, Bremerhavener Institute of Biological Information Systems, Germany

Prof. Dr. Gürbüz GÜNEŞ (gunesg@itu.edu.tr)

Istanbul Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Food Engineering, Turkey

Prof. Dr. Marcello IRITI (marcello.iriti@unimi.it)

Milan State University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Agricultural and Environmental Sciences, Italy

Prof. Dr. Herbert W. OCKERMAN (ockerman.2@osu.edu)

Ohio State University, Department of Animal and Food Sciences, USA

Prof. Dr. Abdullah ÖKSÜZ (aoksuz@konya.edu.tr)

University of Necmettin Erbakan, Faculty of Health Sciences, Turkey

Prof. Dr. Peter RASPOR (Peter.Raspor@fvz.upr.si)

University of Primorska, Faculty of Health Sciences, Institute for Food, Nutrition and Health, Slovenia

Prof. Dr. Zdzislaw E. SIKORSKI (zdzsikor@pg.gda.pl)

Gdańsk University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Food Chemistry, Technology, and Biotechnology, Poland

Prof. Dr. Krzysztof SURÓWKA (rtsurowk@cyf-kr.edu.pl)
University of Agriculture, Faculty of Food Technology, Poland

Prof. Dr. Petras Rimantas VENKUTONIS (rimas.venskutonis@ktu.lt)
Kaunas University of Technology, Department of Food Science and Technology, Lithuania

Prof. Dr. Aydın YAPAR (ayapar@pau.edu.tr)
University of Pamukkale, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Turkey

Assoc. Prof. Dr. Joko Nugroho Wahyu KARYADI (jknugroho@ugm.ac.id)
Gadjah Mada University, Faculty of Agricultural Technology, Indonesia

Dr. Alaa El-Din A. BEKHIT (Aladin.bekhit@otago.ac.nz)
University of Otago, Department of Food Science, New Zealand

Dr. Rene' E SCOTT (rscott@twu.edu)
Texas Woman's University, Nutrition and Food Science, Visiting Professor, USA



Vol. 4 Issue 2 Page 80-146 (2018)

Tablo of Contents/İçerik

- 1. FT-IR SPECTROSCOPY CHARACTERIZATION AND CHEMOMETRIC EVALUATION OF LEGUMES EXTRACTED WITH DIFFERENT SOLVENTS**
Pages: 80-88
Sevgin Dıblan, Pınar Kadiroglu, Levent Yurdaer Aydemir
- 2. INVESTIGATING THE POSSIBILITIES FOR USE OF GRAPE SEED POWDER IN THE PRODUCTION OF CALORIE REDUCED COCOA MUFFINS**
Pages: 89-97
Selçuk Mustafa Seçen
- 3. DIETARY SUPPLEMENTS AND THEIR EFFECTS ON HEALTH**
Pages: 98-111
Derya Atalay, Hande Selen Erge
- 4. STUDY OF INCREASING THE PRODUCTION OF VOLATILE FLAVOR COMPOUNDS BY THE YEAST *Kluyveromyces marxianus* THROUGH OPTIMIZATION OF CARBON AND NITROGEN SOURCES**
Pages: 112-123
Müge İşleten Hoşoğlu
- 5. THE SUPPLEMENTARY EFFECT OF BLACK AND GREEN TEA INFUSION ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF KEFIR**
Pages: 124-131
Cem Karagözlü, Gülfem Ünal, A. Sibel Akalın, Ecem Akan, Özer Kınık
- 6. DETERMINATION OF MOULD COUNT, DIVERSITY, THE EFFECT OF STORAGE AND DOMINANT MOULD STRAINS IN RAISIN SAMPLES**
Pages: 132-139
Fulya Turantaş, Özgül Sömek
- 7. SOME CHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF BREADSTICKS PRODUCED BY USING CHIA SEED**
Pages: 140-146
Ezgi Özgören, Hatice Betül Kaplan, Senem Tüfekçi



FT-IR SPECTROSCOPY CHARACTERIZATION AND CHEMOMETRIC EVALUATION OF LEGUMES EXTRACTED WITH DIFFERENT SOLVENTS

Sevgin Dıblan , Pınar Kadiroğlu , Levent Yurdaer Aydemir 

Cite this article as:

Dıblan, S. Kadiroğlu, P., Aydemir, L.Y. (2018). FT-IR spectroscopy characterization and chemometric evaluation of legumes extracted with different solvents. Food and Health, 4(2), 80-88. DOI: 10.3153/FH18008

Adana Science and Technology University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Adana, Turkey

ABSTRACT

In this study, FT-IR spectroscopy was applied for rapid characterization and discrimination of commonly consumed legumes extracted by different solvents in combination with principal component analysis (PCA) for the first time. Dried soy bean, white bean, chickpea, red lentil, and pinto bean were extracted by water (W), ethanol (E), acetone/water (AW) and acetone/water/acetic acid (AA). The effect of each solvent on different legume extracts was demonstrated by identifying the functional groups using FT-IR spectroscopy at mid-infrared (mid-IR) range ($4000-650\text{ cm}^{-1}$) and associated with the amount of total phenolics and other oxidation substrates in the extracts determined by Folin-Ciocalteu method. PCA models with 2 principal components were constructed to discriminate the different legume extracts based on FT-IR spectra and total phenolic content (TPC). FT-IR spectra of each legume were quite different for different solvents but almost the same for the same solvent. Each legume extracts had significantly different TPC from each other extracted with the same or different solvents. The highest TPC was obtained by soybeans and pinto beans extracted with W or E and AW or AA, respectively. PCA analysis of FT-IR spectra and TPC provided clear discrimination between the legume samples extracted with different solvents.

Keywords: Infrared spectroscopy, Legumes, Functional groups, PCA

Submitted: 25.04.2017

Accepted: 07.10.2017

Published online: 14.01.2018

Correspondence:

Pınar KADİROĞLU

E-mail: pkadiroglu@adanabtu.edu.tr

©Copyright 2018 by ScientificWebJournals

Available online at

www.scientificwebjournals.com

Introduction

Legumes are important sources of proteins, carbohydrates, vitamins and minerals, constituting the significant part of human diet. They are also good complement for cereal based foods which are low in essential amino acids and phenolic compounds. However, legumes may exert protective effects on human health by showing antioxidant and anticarcinogenic activities. According to the studies, legumes may prevent and control metabolic diseases, diabetes mellitus, colon cancer, and cardiovascular diseases by providing anti-microbial, cardioprotective, anti-allergenic and anti-inflammatory activities (Chung & Liu, 2012; Hurtado-Fernández, Gómez-Romero, Carrasco-Pancorbo, & Fernández-Gutiérrez Alberto, 2010; Koehnlein et al., 2016; Zhao, Du, Wang, & Cai, 2014). In food production, phenolic compounds extracted from legumes can be used as antioxidant additives in the formulas to prevent oxidation of lipids and provide health promotion (Escarpa & Gonzalez, 2001). To use phenolic compounds in food formulations is challenging in some cases due to different solubility properties of these compounds. According to the studies water and alcohol were the most used solvents to extract phenolic compounds from legumes followed by acetone and acidified acetone (Koehnlein et al., 2016; B. J. Xu & Chang, 2007).

Infrared spectroscopy which is based on the interaction of molecules or atoms with electromagnetic radiation, works by passing a beam of IR radiation through a sample and comparison of the radiation transmitted through the sample with that transmitted without the sample. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) is a simple, rapid and non-destructive vibrational spectroscopic method that provides molecular specific information for the complicated mixture system (Graham Solomon, Craig Fryhle, 2014). Multivariate statistical analysis methods such as principal component analysis (PCA) could be used to generate information from FT-IR data. PCA is an unsupervised discrimination method generating principal components explaining variability in the data set (Eriksson et al., 2001). Studies on FT-IR spectroscopic analyses were performed on discrimination of edible oils (Javidnia, Parish, Karimi, & Hemmateenejad, 2013), prediction of geographical origins of butters (Bassbasi, De Luca, Ioele, Oussama, & Ragno, 2014), classification of tea varieties (Cai, Wang, Xi, Li, & Wei, 2015), detection of authentication and adulteration purposes (Gurdeniz & Ozen, 2009; Li, Wang, Zhao, Ouyang, & Wu, 2015; Rohman, Riyanto, Sasi, & Yusof, 2014; L. Xu, Cai, Cui, Ye, & Yu, 2012) and for differentiation of pea and oat roots (Naumann, Heine, & Rauber, 2010). FT-IR analyses have also potential to be applied to other food commodities to determine their functional groups found in their different

extracts also to discriminate the effects of different solvents on these functional groups.

The aim of this study is to characterize different legumes extracted by different solvents for the first time using their FT-IR spectra and to differentiate the legume extracts depending on their functional groups with PCA method in correlation with their total phenolic contents.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

Folin Ciocalteu reagent, gallic acid, and sodium carbonate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All solvents and chemicals used for analyses were analytical grade.

Legume Samples

Five legume samples that were red lentil (RL), dry (white) bean (DB), pinto bean (PB), chickpea (CP) and soy bean (SB) were purchased from local market in Adana, Turkey. Moisture content of the legumes was determined by drying the sample in an oven at 105°C until a constant weight was obtained (AOAC 2000). TPC of different extracts were expressed on dry weight basis.

Extraction of Legume Samples

The legume samples were grounded with IKA grinder (IKA Works Inc., Wilmington, N.C., U.S.A.). 1 g of legumes powder was extracted in 10 mL of extraction solvent (water, ethanol, acetone/water (50:50, v/v) or acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5, v/v/v) on an orbital shaker (IKA) (300 rpm, 25°C, 3h). The extracts were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C and supernatants were removed (Hettich, Universal 320 R, Germany) and analyzed immediately without any delay. Extractions were performed in 3 replicates for all legume-solvent extraction mixture.

Determination of Total Phenolic Content

Total phenolic content (TPC) of the extracts was determined by a Folin Ciocalteu assay (Singleton & Rossi, 1965) using gallic acid (GA) as the standard. Firstly, 200 µL of the legume extract and 1000 µL of Folin-Ciocalteu's (10-fold diluted in distilled water) reagents solution were mixed and reacted for 3 min and then 800 µL of 7.5% NaCO₃ (w/v) was added into the solution and further incubated for 2 hours at room temperature in the dark. The absorbance of the solutions was measured at 765 nm and TPC results were expressed as gallic acid equivalents (µg of GAE/g dry seed).

Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Analysis

FT-IR spectroscopy was used to characterize the functional groups in the legume extracts. The IR spectrum was obtained by using PerkinElmer Spectrum Two (Perkin Elmer Inc., USA). One drop of each extract was added onto absorbance chamber and the samples were scanned at mid-infrared range from 4000 cm^{-1} to 450 cm^{-1} in triplicate.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Minitab17 (Minitab Inc., State College, USA) software. Analysis of variance (ANOVA) analysis method was applied to demonstrate the significance of differences among the samples at $P < 0.05$ level. PCA analysis was performed by using the spectral ranges of 3750-2750 and 1800-750 cm^{-1} .

Results and Discussion

FT-IR Characterization of Legume Extracts

FT-IR spectroscopy was applied for evaluation of different legume extracts obtained by four different solvents namely water (W), ethanol (E), acetone/water (AW), and acidified acetone/water (AA) in the mid-IR range and given in Figure 1. When the graphs were investigated, it was seen that all legumes gave mostly similar spectra for the same solvent type while completely different spectra for different solvent type. As can be examined, along with small differences between solvents, the bands between wavenumbers 3730-830 cm^{-1} revealed the presence of various phytochemical compounds extracted with different solvents. The major bands in mid-IR range showed that all legume extracts may have distinct compounds such as alcohol, amides, amines, fluoride, iodide, chloride, phosphine, bromide, sulfonates, aliphatic organo halogens, aliphatic and aromatic nitro compounds (Marimuthu & Gurumoorthi, 2013).

All different solvent extractions have led to various bands from high to low wavenumbers; similar with total polyphenol content results which pointed out the significance of solvent type on extraction of bioactive compounds from legumes. As shown in Figure 1, although peaks of DBW were much larger whereas others were downstream or flat, all samples gave similar spectra for water extraction as well as other solvent extractions. The bands between 3730 and 3361 cm^{-1} reflected O-H and N-H stretching for alcohol especially in legumes extraction with ethanol, acetone and acidified acetone. This band also characterizes amines that are found in amino acids, peptides, proteins, alkaloids, DNA and RNA because of amino (NH_2) groups (Marimuthu & Gurumoorthi, 2013). The spectrum of water soluble extract of dry bean was the most different one from other extracts.

It gave two negative peaks between 3600 and 3000 cm^{-1} and 1800 and 1500 cm^{-1} which were identical with the spectra of ethanol and acetone solvent extracts of dry beans. These showed that the dry bean had the functional groups which were soluble in both water and organic solvents. Bands in the region between 1800- 900 cm^{-1} are mainly attributed to fingerprints region for typical absorption of phenolic molecules such as the stretching band of carbonyl (C=O) groups (1712-1704 cm^{-1}). Especially in the spectra of acetone and acidified acetone extraction of legumes, the peaks of 1702-1704 cm^{-1} were very high. Also, bands in the 1680-900 cm^{-1} region correspond to phenols. The bands between 1448-1444 cm^{-1} are due to the asymmetric in-plane bending of $-\text{CH}_3$ (Silva, Feliciano, Boas, & Bronze, 2014) which is also the same spectral region reflecting to the phenyl nuclei (C=C bonds) in ethanol extracts of legumes. The biochemical compositions, especially carbohydrate, lipid, protein structures and polyphenols give absorption bands in the 1800 to 900 cm^{-1} region (Silva et al., 2014). As shown in Table 1, according to the solvent extraction methods, the spectra collected by FT-IR were differed from each other. For example, the 1295-1232 cm^{-1} region corresponding to O-C-H bending of phenolic compounds (Lu et al., 2011; Singh et al., 2016) were obtained from all extracts except water extracts of red lentil and dry bean. It was noteworthy that the region between 1563 and 1551 cm^{-1} which was corresponding to amide II C-N and N-H stretching of proteins were found in water extracts of legumes. The absorption bands that were attributed to C-C stretching vibration of phenyl at 1657-1632 cm^{-1} region were observed in all legume extracts. However, the bands at 891-830 cm^{-1} indicated C-C-O in plane stretching of primary and secondary alcohols and CH deformation (polyphenols) and the band at 1338 cm^{-1} referred to C-O stretching vibration of phenyl obtained from legumes extracted with ethanol mainly (Lin-Vien et al., 1991; Lu et al., 2011; Silva et al., 2014). In the study reported by Marimuthu & Gurumoorthi (2013), phytochemical and FT-IR spectroscopic analysis was performed to determine the chemical constituents and to identify the functional groups in velvet bean, horse gram, lima bean and jack bean. FT-IR analysis results revealed the presence of alcohol and hydroxyl groups, alkane groups, alkenes groups, nitrogen-oxy groups, sulfuroxy groups, aryl groups, aliphatic iodo groups in wild and common legumes.

Table 1. Functional groups and modes of vibrations of legume extracts

Frequency (cm ⁻¹)	Functional group assignment	References
3712-2839	Hydroxyl compounds	(Hu et al., 2016; Silva et al., 2014)
2938	CH ₂ from lipids	(Lu et al., 2011)
2341-2337	CO ₂ group	(Sanati & Andersson, 1993)
1704-1702	Carbonyl groups; C=O bonds for lipids	(Silva et al., 2014; Lu et al., 2011)
1657-1632	C=C stretching of phenyl	(Silva et al., 2014)
1657-1632	Amide I (C=O stretching): proteins and peptides, native protein	(Demir et al., 2015; Guerrero et al., 2014)
1563-1551	Amide II (C-N and N-H stretching): proteins	(Demir et al., 2015; Naumann et al., 2010)
1551-1460	N-H bonds, proteins	(Guerrero et al., 2014)
1429-1411	C-H and O-H bending, -CH ₃	(Silva et al., 2014; Singh et al., 2016)
1385-1367	Cellulose, phosphine, sulfate groups	(Demir et al., 2015; Guerrero et al., 2013; Marimuthu & Gurumoorthi, 2013; Naumann et al., 2010)
1338	C-O stretching (phenyl), C-H bending and CH ₂	(Lu et al., 2011; Silva et al., 2014)
1295-1232	O-C-H bending (phenolic), O-H in-plane, Amide III proteins, sulphates	(Lu et al., 2011; Singh et al., 2016)
1099-1074	Carbohydrate (Starch, pectin), C-O stretching (ester), ester sulfates rings	(Guerrero et al., 2013; Singh et al., 2016)
1046	Flurides, -CH ₂ OH (carbohydrate), -CH ₃ (poly-saccharide)	(Lu et al., 2011)
928-911	Starch	(Demir et al., 2015)
891-881	C-C-O in phase stretching of primary and secondary alcohols	(Lin-Vien et al., 1991)
830	C-H deformation (polyphenols)	(Lu et al., 2011)

PCA analysis was performed to aim at interpreting the FT-IR results for discrimination of legume samples according to the solvent types. PCA model was constructed with 2 principal components account for 98.1 % of total variance. PC1 explained 78.6 % of the variance and PC2 explained 19.5% of total variance. PCA score plot for the first two principal components of legume extracts' FT-IR spectra was shown in Fig. 2a. Samples were discriminated clearly according to solvent types. A few numbers of studies were performed on FT-IR analysis of legume extracts. In one of these studies, different kidney bean and field pea line protein isolates were investigated to determine their functional properties by FT-IR method in relation with PCA and it was reported that β -sheets, β -turns and α -helix were the major secondary structures in kidney bean and field pea line (Shevkani, Singh, Kaur, & Rana, 2015).

Total Phenolic Compounds of Legumes Extracted By Different Solvents

Although detailed chromatographic characterization methods are being applied to determine the phenolic content of plant samples, Folin–Ciocalteu (F–C) method still has been proposed as a standardized method for determination of total phenolic content of food products. Despite the method allows some interactions with the results of phenolic contents, it is still a point of origin for detailed characterizations especially when the subject is antioxidant potential. Folin–Ciocalteu method measures the phenolic acids also with soluble proteins and carbohydrates which are readily oxidizable under test conditions in the sample. In literature, TPC of different legumes were determined using different solvents, pretreatments, or equivalents which reports different results causing the inconsistency. Thus, there was a need for comparison of TPCs obtained from different extraction sys-

tems applied to different legume types. According to the measurements, TPC of different legume samples varied from 1704 to 3095 $\mu\text{g GA/g}$, from 560 to 2973 $\mu\text{g GA/g}$, from 875 to 1692 $\mu\text{g GA/g}$, and from 535 to 6055 $\mu\text{g GA/g}$ in their water soluble, ethanol soluble, acetone/water soluble, and acidified acetone/water soluble extracts, respectively (Table 2). Soybean had the highest TPC values in its W and E extracts, while pinto bean had the highest TPC in its AW and AA extracts. The significant differences were determined between TPC values of different solvent extracts of each legume ($P < 0.05$). The similar significant differences were also demonstrated between the TPC values of different legumes extracted with the same solvent. TPCs of ethanol soluble extracts of each legume were significantly lower than those of water soluble extracts indicating that water soluble proteins also contributed to the TPC. This situation was clearly seen in FT-IR spectra obtained for legumes extracted with water and ethanol. FT-IR spectrum of water extracts of legumes had the C = O stretching amide I, N-H bending and C-N stretching amide II, and N-H bending and C-H stretching amide III bands belonging to proteins while these bands were absent in the FT-IR spectrum of ethanol extracts of legumes. In plants, total phenolic compounds were mainly evaluated by summation of water soluble and alcohol soluble extracts of sample. In this respect, soybean had the highest total phenolic content followed by in order of pinto bean, chickpea, red lentil and dry bean. Acetone extractions of legume samples contained both acetone and water soluble fragments of legumes and acidification of this solvent significantly increased or decreased the total phenolic content of legume extracts ($P < 0.05$). The similar extraction methods were applied by Xu and Chang (2007) who compared the total phenolic content, total flavonoid content and condensed tannin content in different legume extracts by different

solvent systems. The TPCs of soybean extracts obtained by AW and AA were comparable however total phenolic content of ethanolic extracts of chickpea and yellow soybean could not be determined. TPCs of acetone and acidified acetone extracts of chickpea and lentil were almost 2 and 5 fold higher than those obtained in this study. Similar to our findings, Oomah et al. (2011) determined the highest TPC in red lentils extracted with water followed by acetone and ethanol solvents. Koehnlein et al. (2016) found significant but low positive correlation between TPC and antioxidant activities of different legume extracts obtained by water as a solvent. For this reason, the legume samples could be used as antioxidant additive in functional foods after suitable solvent extractions compatible with the process of food product. Strong and positive correlation was also determined between the acetone extracts and acidified acetone extracts of legumes with Pearson correlation coefficient (r) of 0.937 while positive correlations were observed between water extracts and ethanol extracts ($r=0.703$) and acidified acetone extracts ($r=0.748$) (Data not shown) ($P < 0.05$). PCA score plots for the first two principal components of legume extracts' FT-IR spectra and total phenolic contents according to legume type and solvent system were given in Fig. 2b and 2c. PCA models according to legume types were constructed with 2 principal components account for 92 % of total variance. PC1 explained 82 % of the variance and PC2 explained 10 % of total variance. PCA models according to solvent types were constructed with 2 principal components account for 99 % of total variance. PC1 explained 88 % of the variance and PC2 explained 11 % of total variance. PCA score plots demonstrated the clear discrimination among the samples according to legume types and solvent systems in correlation with FT-IR data.

Table 2. Total phenolic content of legume samples extracted with different solvents ($\mu\text{g GA/g dry legume}$)

	Red lentil	Dry bean	Pinto bean	Chickpea	Soybean
Water extraction	2254 \pm 31 ^{aC*}	1704 \pm 19 ^{aE}	2721 \pm 21 ^{cB}	1829 \pm 12 ^{aD}	3095 \pm 21 ^{aA}
Ethanol extraction	853 \pm 12 ^{dCD}	560 \pm 42 ^{cD}	1319 \pm 4 ^{dBC}	1478 \pm 79 ^{bB}	2973 \pm 21 ^{bA}
Acetone extraction	1307 \pm 23 ^{cD}	1384 \pm 12 ^{bC}	5465 \pm 49 ^{bA}	875 \pm 21 ^{cE}	1692 \pm 18 ^{cB}
Acidified acetone extraction	1428 \pm 16 ^{bC}	535 \pm 31 ^{cE}	6055 \pm 45 ^{aA}	729 \pm 24 ^{dD}	3104 \pm 32 ^{aB}

* Different superscript lower-case letters in each column show significant difference at $P < 0.05$. Different superscript capital letters in each row show significant difference at $P < 0.05$

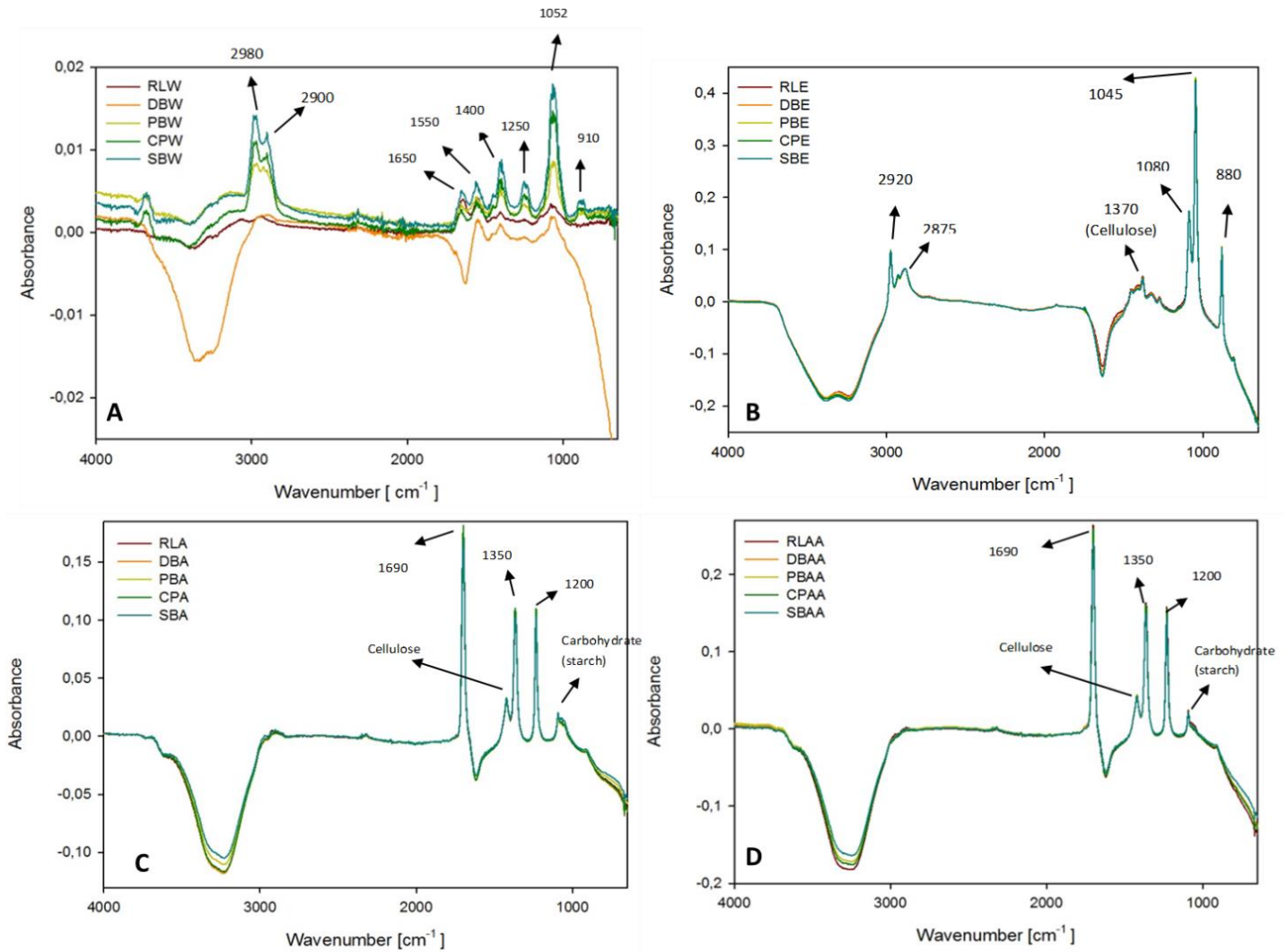


Figure 1. FT-IR spectra of legumes extracted with **A)** water (W) **B)** ethanol (E) **C)** acetone/water (50:50%) (AW) **D)** acetone/water/acetic acid (70:29.5:0.5 %) (AA). RL: Red lentil, DB: Dry (white) bean, PB: Pinto bean, CP: Chickpea, SB: Soybean.

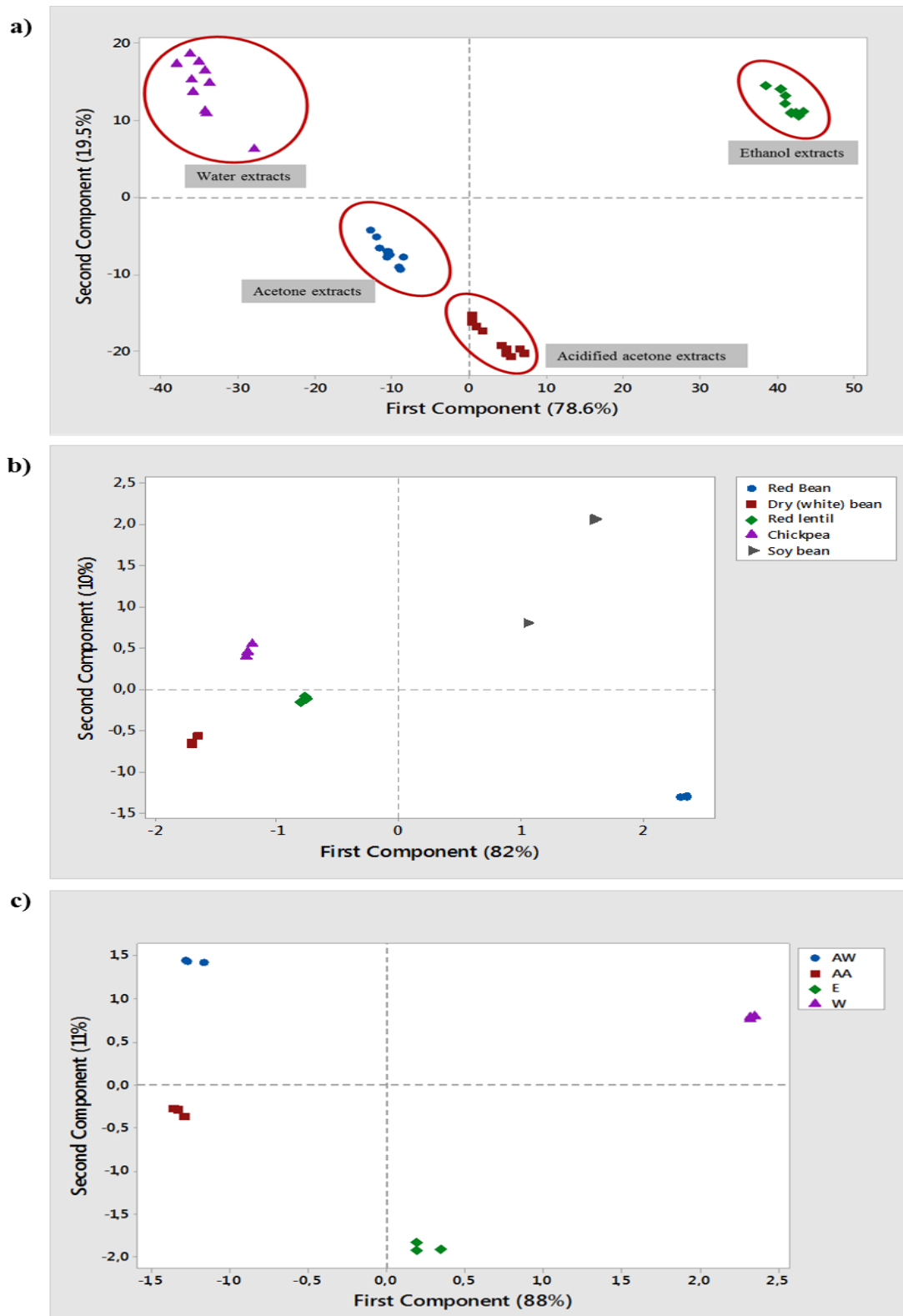


Figure 2. PCA score plot for the first two principal components of legume extracts' a) FT-IR spectra b) phenolic contents according to legume type c) phenolic contents according to solvent system

Conclusion

In this study, the effect of solvent type on legume extracts was clearly demonstrated in a rapid way using FT-IR spectroscopic analysis in combination with chemometrics for the first time. The main functional groups were determined with FT-IR spectra of different legume extracts. Legume samples were successfully classified with PCA model constructed with two principal components according to the extraction method with different solvents. TPC analysis also showed that there were great variations in TPC of different solvent extracts in each legume based on legume type and solvent system in correlation with the FT-IR spectra of legume extracts. Moreover, the more practical comparison between the functional groups of different legumes obtained by different solvents was provided. This study revealed that FT-IR could be used potentially for rapid characterization of functional groups in legume samples to generate a general perspective based on different extraction systems in relation with phenolic content analysis.

Acknowledgement

This work was partially supported by Adana Science and Technology University Scientific Research Coordination Unit. Project Number: MÜHDBF.GIDA.2015-14.

References

- Bassbasi, M., De Luca, M., Ioele, G., Oussama, A. & Ragno, G. (2014). Prediction of the geographical origin of butters by partial least square discriminant analysis (PLS-DA) applied to infrared spectroscopy (FTIR) data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(2), 210–215.
- Cai, J.X., Wang, Y. F., Xi, X. G., Li, H. & Wei, X. L. (2015). Using FTIR spectra and pattern recognition for discrimination of tea varieties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 439–446.
- Chung, H.-J. & Liu, Q. (2012). Physicochemical properties and in vitro digestibility of flour and starch from pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(1), 131–137.
- Demir, P., Onde, S., Severcan, F. (2015). Phylogeny of cultivated and wild wheat species using ATR-FTIR spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135, 757–763.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wold, S. (2001). *Multi- and mega-variate data analysis: principles and applications*. Umea: Umetrics Academy, p. 533, ISBN 9197373052
- Escarpa, A., Gonzalez, M.C. (2001). Total extractable phenolic chromatographic index: an overview of the phenolic class contents from different sources of foods. *European Food Research and Technology*, 212, 439–444.
- Graham Solomon, T.W., Craig Fryhle, S.S. (2014). Families of Carbon Compounds. In *Organic Chemistry* (p. 86–98). John Wiley & Sons Singapore Pte. Ltd. ISBN 978-975-8431-87-8
- Guerrero, P., Garrido, T., Leceta, I. & De La Caba, K. (2013). Films based on proteins and polysaccharides: Preparation and physical-chemical characterization. *European Polymer Journal*, 49(11), 3713–3721.
- Guerrero, P., Kerry, J.P., De La Caba, K. (2014). FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends. *Carbohydrate Polymers*, 111, 598–605.
- Gurdeniz, G., Ozen, B. (2009). Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food Chemistry*, 116(2), 519–525.
- Hu, Y., Pan, Z.J., Liao, W., Li, J., Gruget, P., Kitts, D.D., Lu, X. (2016). Determination of antioxidant capacity and phenolic content of chocolate by attenuated total reflectance-Fourier transformed - infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 202, 254–261.
- Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., Fernández-Gutiérrez Alberto, A. (2010). Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(5), 1130–1160.
- Javidnia, K., Parish, M., Karimi, S., Hemmateenejad, B. (2013). Discrimination of edible oils and fats by combination of multivariate pattern recognition and FT-IR spectroscopy: A comparative study between different modeling methods. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 104, 175–181.
- Koehnlein, E.A., Koehnlein, E.M., Correa, R.C.G., Nishida,

- V.S., Correa, V.G., Bracht, A., Peralta, R.M. (2016). Analysis of a whole diet in terms of phenolic content and antioxidant capacity: effects of a simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(6), 614-623.
- Li, B., Wang, H., Zhao, Q., Ouyang, J., Wu, Y. (2015). Rapid detection of authenticity and adulteration of walnut oil by FTIR and fluorescence spectroscopy: A comparative study. *Food Chemistry*, 181, 25-30.
- Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselli, J.G. (1991) *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. London: Academic Press, p. 45-60, ISBN 0124511600.
- Lu, X., Wang, J., Al-Qadiri, H. M., Ross, C. F., Powers, J. R., Tang, J. & Rasco, B. A. (2011). Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 129(2), 637-644.
- Marimuthu, M., Gurumoorthi, P. (2013). Phytochemical Screening and FT-IR Studies on Wild and Common South Indian Legumes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6, 141-144.
- Naumann, A., Heine, G. & Rauber, R. (2010). Efficient discrimination of oat and pea roots by cluster analysis of Fourier transform infrared (FTIR) spectra. *Field Crops Research*, 119(1), 78-84.
- Oomah, B.D., Caspar, F., Malcolmson, L.J., Bellido, A. S. (2011). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*, 44(1), 436-441.
- Rohman, A., Riyanto, S., Sasi, A. M. & Yusof, F. M. (2014). The use of FTIR spectroscopy in combination with chemometrics for the authentication of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam) oil from sunflower and palm oils. *Food Bioscience*, 7, 64-70.
- Sanati, M. & Andersson, A. (1993). DRIFT study of the oxidation and the ammoxidation of toluene over a TiO₂(B)-supported vanadia catalyst. *Journal of Molecular Catalysis*, 81, 51-62.
- Shevkani, K., Singh, N., Kaur, A. & Rana, J. C. (2015). Structural and functional characterization of kidney bean and field pea protein isolates: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 43, 679-689.
- Silva, S. D., Feliciano, R. P., Boas, L. V. & Bronze, M. R. (2014). Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 150, 489-493.
- Singh, R. K., Kukrety, A., Sharma, O. P., Baranwal, S., Atray, N. & Ray, S. S. (2016). Study of a novel phenolic-ester as antioxidant additive in lube, biodiesel and blended diesel. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 37, 27-31.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Xu, B.J., Chang, S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(2), 159-166.
- Xu, L., Cai, C.B., Cui, H.F., Ye, Z.H., Yu, X.P. (2012). Rapid discrimination of pork in Halal and non-Halal Chinese ham sausages by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics. *Meat Science*, 92(4), 506-510.
- Zhao, Y., Du, S., Wang, H., Cai, M. (2014). In vitro antioxidant activity of extracts from common legumes. *Food Chemistry*, 152, 462-466.



INVESTIGATING THE POSSIBILITIES FOR USE OF GRAPE SEED POWDER IN THE PRODUCTION OF CALORIE REDUCED COCOA MUFFINS

Selçuk Mustafa Seçen 

Cite this article as:

Seçen, S.M. (2018). Investigating The Possibilities for Use of Grape Seed Powder in The Production of Calorie Reduced Cocoa Muffins. Food and Health, 4(2), 89-97. DOI: 10.3153/FH18009

Department of Food Engineering,
Nevşehir Hacı Bektaş Veli University,
Nevşehir 50300, Turkey

ABSTRACT

Scientific studies in recent years have clearly demonstrated the relationship between diets and diseases, and epidemiological studies indicate the effect of diet on the prevention of chronic diseases. The food industry develops day by day in order to offer more variety of products and to produce healthy foods. Emerging technology, intense participation in business life and urbanization, and people's preferences for food consumption are changing rapidly. Products such as muffins, biscuits, crackers and wafers (easy-to-carry, long shelf-life) are often confused as products consumed by individuals who have to devote less time to feeding. Muffin; have high nutritional value (due to the high carbohydrate, protein, and fat in them) but it is not rich enough in terms of vitamins, dietary fiber, and minerals necessary for body mechanics. In recent years, functional properties of products have been improved with the addition of dietary fiber additives as well as natural foodstuffs with antimicrobial and antioxidant properties. This study aimed to produce calorie reduced muffins by using grape seed powder which is a natural antioxidant and fiber source in cocoa muffin formulas. On the other hand, it is aimed to economically evaluate the wastes of the wine industry as well as to produce functional muffins with increased benefits on human health, in other words the aim of this study is to remove the oil, sugar and flour content of the muffin from the mixture at varying proportions and replace the removed part with grape seed powder. As a result of the study, it was observed that the grape seed powder supplementation did not affect the volume properties of the muffins, on the contrary, decreased the baking loss, and the products replaced with grape seeds powder have been opened in both interior and exterior colours. It can be said that the product group which is closest to the control in respect of the textural properties is the products produced with 2.5% substitution.

Keywords: Cacao Muffin, Calorie reduced, Grapeseed, Texture profile analysis

Submitted: 14.05.2017

Accepted: 17.10.2017

Published online: 20.01.2018

Correspondence:

Selçuk Mustafa SEÇEN

E-mail: mustafa-secen@hotmail.com

©Copyright 2018 by ScientificWebJournals

Available online at

www.scientificwebjournals.com

Introduction

Scientific studies in recent years have clearly demonstrated the relationship between diets and diseases, and epidemiological studies indicate the effect of diet on the prevention of chronic diseases (Mete, 2008). Changing eating habits to more fruit, vegetables, and grains is an effective and practical approach to the prevention of chronic diseases (Bozhüyük et al., 2012). It is a known fact that more prevalent approaches to treatment are supposed to be superior. In recent years, it has been scientifically proven that some foods are prevented from taking some "natural" pathways into the body, or some diseases are treated partly, which has increased the importance of nutritional support in protecting our health. For this reason, functional foods and natural health products have become more consumed in daily diets (Coşkun, 2005). The food industry develops day by day in order to offer more variety of products and to produce healthy foods (Malek, 2013). Emerging technology, intense participation in business life and urbanization, and people's preferences for food consumption are changing rapidly. Products such as muffins, biscuits, crackers, and wafers (easy-to-carry, long shelf-life) are often confused as products consumed by individuals who have to devote less time to feeding (Seçen, 2016). Muffin is a bakery product which is produced almost everywhere in the world and which is highly preferred due to its soft texture and high quality, easy to produce and appeal to consumers (Dizlek, 2008; Martinez-Cervera, Salvador, & Sanz, 2014). Muffin products are an important part of the bakery industry (Martinez-Cervera, Salvador, & Sanz, 2015). Muffin; have high nutritional value (due to the high carbohydrate, protein, and fat in them) but it is not rich enough in terms of vitamins, dietary fiber, and minerals necessary for body mechanics (Malek, 2013). Grape (*Vitis vinifera* L.) is one of the most produced fruits of the world (Wang et al., 2017). Grape seeds are rich sources of monomeric phenolic compounds and procyanidins (Arvanitoyannis, Ladas, & Mavromatis, 2006; López-Miranda et al., 2016). It is known that these compounds act as antimutagenic and antiviral agents (Saito, Hosoyama, Ariga, Kataoka, & Yamaji, 1998). By using components that have functional characteristics in the production of baked goods, consumption of these foods and components that have beneficial effects on human health can be provided to participate in the human diet. By using components that have functional characteristics in the production of baked goods, consumption of these foods and components that have beneficial effects on human health can be provided to participate in the human diet. With dietary fiber additives, the functional properties of the products are increased and the intestinal system is regulated to provide health benefits (Ekici & Ercoskun, 2007). In recent

years, functional properties of products have been improved with the addition of dietary fiber additives as well as natural foodstuffs with antimicrobial and antioxidant properties (Meral & Doğan, 2009). Grape seed, a by-product of the wine industry, has a significant level of antioxidant activity. This study aimed to produce calorie reduced cacao muffins by using grape seed powder which is a natural antioxidant and fiber source in cocoa muffin formulas. It is thought that the grape seed is transformed into a product which is the entry into the economy. Another goal is to reduce the calories of the products by making changes in the prescriptions of the cacao muffins.

Materials and Methods

Materials

The basic ingredients (wheat flour, sunflower oil, sugar, eggs, milk, baking soda, salt, and cocoa) used for making muffins were obtained from the local market. Grape seeds to be substituted for flour, sugar, and oil used in the production of cacao muffins were obtained from grapes (Dimrit) supplied from the farm in the year 2016 harvest.

Methods

Grape seeds were milled for 4 minutes at 400 rpm in ball mills and the particle size is reduced to less than 1 micron. In the experiment, grape seed powder has been substituted (2.5%, 5%, and 10%) for flour, oil, and sugar (total weight). Baking losses, specific volumes, volume, symmetry and uniformity index, cacao muffin crust and crumb colours were determined for products cooked in equal conditions. The products were stored for 1, 3 and 5 days and subjected to textural analyses in order to measure their structural properties.

Cacao Muffin Cooking Experiments

Baking times and formulations of cacao muffins were taken from one of the previous studies and revised (Karaoglu, Kotancilar, & Gercekaslan, 2008). The cacao muffin formulations are given in Table 1, the sequence and the timing given in Table 2 were used in the Laboratory of Food Engineering Department of Hacı Bektaş Veli University. Theoretical calorific values of the cacao muffins are also given in the calculated Table 1. Accordingly, Table 1, the decline of 2.5% in prescription led to a 0,98% decrease, the decline of 5% in prescription led to a 2,06% decrease, the decline of 10% in prescription led to a 4,12% decrease in the theoretical caloric value of cacao muffins. Cacao muffin dough was obtained in the mixer (Kenwood KM-242 Prospero) in accordance with the stated order and period. Cacao muffin mixture was poured 60 grams per gram of Teflon

muffin molds (Kaiser Gourmet Muffin Pan-Germany) and cooked (Arçelik MF44) for 35 minutes at 175 ° C.

Analyses Made in Cacao Muffins

Specific volume, baking loss, volume, symmetry, uniformity (index of homogeneity), crust and crumb colour measurements were started 1 hour after the product was removed from the oven. In addition, texture profile analysis, and sensory analysis were performed on the produced cacao muffins.

Specific Volume, Baking Loss

The produced cacao muffins were weighed on an analytical scale (BEL, S1002-South Korea) with a weighing accuracy of 0.01 g and the volume was determined according to the method of displacement with rapeseed.

Volume, symmetry, uniformity (homogeneity) index

Volume, symmetry, uniformity index was determined in millimetres from the ruler (5cm) according to AACC 10-91 method (Committee, 1983). Although the volume index does not measure the actual volumes of the cacao muffins, it gives an idea of the volume of the cacao muffins and there is a correct relationship between volume index and volumes. In the cacao muffin industry, the symmetry index is used to determine the profile of the outlines of the cacao muffins, the increase in the symmetry index indicates the swelling, while the decrease indicates that the cacao muffin has a flat

upper surface. The uniformity index represents the symmetry of the cacao muffin laterally, and it is desirable that this value is as close to zero as possible. It is stated that the negative or positive value of this index value is an undesirable condition in cacao muffins (Özer, 2004).

Cacao muffin crust and interior colour measurements

The crust and crumb of cacao muffins; lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*) values of samples were measured by a CR-400 Minolta colorimeter (Konica Minolta Sensing Americas Inc., Ramsey, NJ). Calibration was performed prior to colour measurement using a white plate ($Y = 87.0$, $x = 0.3180$, and $y = 0.3355$) provided by the manufacturer. Each sample was evaluated at six locations on the cacao muffin crust and crumb surface (İ. Çelik, Kotancılar, H.G., 1995).

Texture profile analysis (TPA)

Texture Analyzer (TA-XT Plus Stable Micro Systems, UK) was used to determine the textural properties of the cacao muffins. Cylindrical probes (P / 36) with a diameter of 36 mm were used for TPA tests in the samples taken with 30 mm diameter and 30 mm height probes. The test parameters are set as follows; pre-test speed 1 mm / sec, test speed 2 mm / sec, post-test speed 1 mm / sec, waiting time 5 sec and trigger force 5 g. Hardness, adhesiveness, elasticity values were obtained from the obtained TPA curve and other parameters were derived from these values.

Table 1. Rate of Cacao Muffins Ingredients

Compounds	%	Control Group	2.5% Reduced	5% Reduced	10% Reduced	Theoretical Calorie Value kcal/g
Egg White (g)	11.4	114	114	114	114	17
Salt (g)	0.05	0.5	0.5	0.5	0.5	0
Sugar (g)	25.6	256	249.6	243.2	230.4	4
Whole Milk (g)	17	170	170	170	170	6.4
Sunflower Oil (g)	11.36	113.6	110.76	107.92	102.24	9
Egg Yolk (g)	2.3	23	23	23	23	55
Cocoa (g)	2.89	28.9	28.9	28.9	28.9	4.3
Grape Seed Powder (g)	0	0	16.46	32.93	65.86	0
Baking powder (g)	0.5	5	5	5	5	0.97
Flour (g)	28.9	289	281.78	274.55	260.1	3.64
Total Theoretical Calorie Value (kcal)	-	7518	7444	7363	7208	-
Percentage Decrease in Calorie (%)	-	-	0.98	2.06	4.12	-
Total	100%	1000 g	1000 g	1000 g	1000 g	-

Percentage based on the total weight of flour, sugar, and oil (2,5, 5 and 10%) from the cacao muffin components, instead of the reduced value added grape seed powder.

Table 2. Cacao muffins Production Flow Chart

Compounds	Mixing time (min)
Egg White + Salt	3
Sugar	1
Milk	2
Sunflower Oil +Egg Yolk	2
Flour + Cocoa + Baking Powder + Grape S. Powder	4

Sensory Analysis

The cacao muffins prepared with different formulations were evaluated by sensory analysis by panelists. Crust colour, crust thickness, crumb colour, porosity, elasticity, humidity, taste, odour, swallowability, mouth feel and overall acceptability were determined separately, the scoring form was prepared so that the panelists would understand best. The study was made with single-blind; the panelists did not know the content of the sensory analysis product. A score was created according to the hedonic scale, thus differences in taste between the products were determined (Altuğ & Elmacı, 2005). All panelists participating in the panel provided detailed information on the definition of scale forms. The desired textural and sensory structures of the cocoa muffins are described in detail in the panelists, the scores and the responses given in the sensory analysis are as follows; 0: absolutely unacceptable, 3: unacceptable, 5: neither acceptable nor unacceptable, 7: acceptable, 10: Absolutely acceptable. Sensory evaluations were made at different times and individually in a quiet and isolated environment. It is ensured that the panel area is a simple and airy space. In order for panelists to be able to make independent assessments, all conditions were met and water was provided in the panel area to neutralize the taste change between the products.

Statistical analyses

The research was carried out in 3 replicates according to the research plan based on the full chance of 2x4 factorial regeneration. the data obtained on the basis of the research were subjected to analysis of variance using the SPSS package program. The averages for the variation sources were compared using the Duncan Multiple Comparison Test. Experimental design: In the experiment, grape seed powder has been substituted (2.5%, 5%, and 10%) for flour, oil, and sugar (total weight), in this state, 4 groups of cacao muffins were produced.

Results and Discussion

Volume, symmetry, uniformity index and specific volume, baking loss results in the produced cacao muffins are given in Table 3. It is stated that the cacao muffin structure desired by the consumer is in a high volume, symmetrical and uniform structure. The volume index is a parameter that not only measures the actual volumes of cacao muffins but also gives an idea of volume. The symmetry index is used, in particular, to determine the profile lines of the cacao muffins in the muffin industry. The symmetry index increases when the muffin is swollen from the center and decreases when the muffin has a flat upper surface (Mercan, 2000). The uniformity index gives information about the lateral symmetry of the muffins (Bath, Shelke, & Hosene, 1992).

When Table 3 is examined, it is seen that replacing flour, oil, and sugar used in cacao muffin production with grape seed powder does not affect the volume, symmetry, uniformity indexes. The control group was found to have the highest specific volume of cacao muffins. It has been found that the grape seed powder reduces the specific volume, in this respect it can be said that the changing rates significantly affect the specific volume statistically. It can be said that the control group of cacao muffins and 2.5% cacao muffins are statistically more than the others of cooked losses. The cooking loss is a criterion that must be determined from the point of attachment of the final product weight, which must be written on the packaging, especially in commercial productions and it is not desirable to consumers. Parallel to the increase in the cooking loss during the production of cacao muffins, the undesirable dimensional downsizing of the cacao muffin can also occur. In addition, depending on the loss of cooking, the product may also be dry. Many uncontrollable factors (oven temperature, ambient temperature, etc.) can affect cooking loss (Yıldız, 2010).

The most important factor affecting the taste of cacao muffins is the outer appearance of the cacao muffin and the crust colour, one of the most important criteria in cocoa muffins is the outer crust and the crumb colour of the cacao muffin (Karaoğlu, 1998). The L^* , a^* , b^* values of the produced

cacao muffins were measured with a colorimeter and the results of these values are given in Table 4.

Table 3. Volume, symmetry, uniformity index and specific volume, baking loss results of cacao muffins produced with grape seed powder

	n	Volume Index (mm.)	Symmetry Index (mm.)	Uniformity Index (mm.)	Specific volume (cc/g)	Baking loss (%)
Mix Ratio						
Control	4	116.67±1.20 ^a	25.33±0.33 ^a	0.67±1.45 ^a	2.21±0.31 ^a	14.96±0.66 ^a
2.5% Reduced	4	112.67±1.85 ^a	26.00±0.00 ^a	2.00±3.05 ^a	2.04±0.01 ^b	11.64±0.79 ^a
5% Reduced	4	116.00±1.66 ^a	22.00±1.52 ^a	2.00±0.57 ^a	1.97±0.01 ^b	11.36±0.49 ^b
10% Reduced	4	113.33±1.66 ^a	25.67±2.02 ^a	1.00±2.02 ^a	1.98±0.03 ^b	13.53±0.33 ^b
P		-	-	-	**	**

Data were averages of three different samples ± standard deviation. Values followed by different letters in each column indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatments. Percentage based on the total weight of flour, sugar, and oil (2.5, 5 and 10%) from the cacao muffin components, instead of the reduced value added grape seed powder.

Table 4. Crust and interior *L*, (+) *a* and (+) *b* colour values of cacao muffins produced with grape seed powder

	n	Crust <i>L</i> * value	Crust (+) <i>a</i> * Value	Crust (+) <i>b</i> * Value	Crumb <i>L</i> * Value	Crumb (+) <i>a</i> * Value	Crumb (+) <i>b</i> * Value
Mix Ratio							
Control	4	29.99±0.12 ^d	11.48±0.10 ^d	12.74±0.12 ^d	27.83±0.28 ^d	11.88±0.12 ^{ab}	15.42±0.12 ^d
2.5% Reduced	4	32.56±0.56 ^c	12.34±0.09 ^c	14.96±0.15 ^c	30.54±0.29 ^c	12.07±0.06 ^a	16.88±0.02 ^c
5% Reduced	4	34.73±0.15 ^b	13.08±0.19 ^b	17.93±0.02 ^b	35.61±0.17 ^b	11.58±0.05 ^b	17.99±0.15 ^b
10% Reduced	4	37.08±0.56 ^a	13.93±0.25 ^a	21.40±0.34 ^a	41.97±0.21 ^a	10.80±0.14 ^c	18.44±0.17 ^a
P		**	**	**	**	**	**

Data were averages of three different samples ± standard deviation. Values followed by different letters in each column indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatments. Percentage based on the total weight of flour, sugar, and oil (2.5, 5 and 10%) from the cacao muffin components, instead of the reduced value added grape seed powder.

When Table 4 is examined, it was observed that adding grape seed powder to the cacao muffins had a very significant effect on the cacao muffin crust and crumb *L*, (+) *a* and (+) *b* colour values ($p < 0.01$). As the grape seed powder substitution rate increases, the cacao muffin crust, and interiors colour are opened, reddish and yellowish. In addition, the outer profiles of the cacao muffins produced are photographed and given in figure 1. the crumb profiles of the cacao muffins produced are photographed and given in figure 2.

As can be seen from the photographs, the increase of the grape seed powders in the cacao muffin mix caused the product to open in colour.

It has been pointed out that the variation of basic ingredients in food production greatly affects the textural properties of the final product (Aguilera & Stanley, 1999). The resulting cacao muffins were subjected to textural profile analyses and the hardness, adhesiveness, resilience, cohesiveness,

gumminess and chewiness values were obtained. The average values of these values are given in Table 5.

When Table 5 was examined, it was observed that control group cacao muffins became harder on day 1 storage, this has not changed in storage for 3 and 5 days. On the other hand, it has been determined that as the storage time increases, the hardness increases, the hardest cacao muffins are stored for 5 days. All baked goods have a series of physical and chemical changes called staling after the baking phase. The most important parameter related to staling is the gradual increase in the hardness of the product. It is known that the retrogradation of starch together with staling hardens the starch gel (Seyhun, 2004). The control group cacao muffins showed 3 and 5 days' storage result, chewiness and chewiness values higher than the other group cacao muffins. With the increase of storage period, the hardness and gumminess values of cacao muffins increased and cohesive and elasticity (resilience) values decreased. The retrogradation

of amylose from the starch components is faster than amylopectin and the retrogradation is completed when the product is cooled after baking. However, since the amylopectin is retrograde at a lower rate, the product continues to retrograde after being cooled and is therefore considered to be the main effect of staling (BeMiller, Whistler, & Carbohydrates, 1996). Therefore, it is observed that the hardness value increases as the product become stale. Another parameter that affects cacao muffin hardness is the moisture loss of the cacao muffin along with storage. It is stated in the literature that hardness value increases with storage in cacao muffins (T. E. Çelik, 2012; Kaçar, 2010; Malek, 2013). The stickiness parameter was not statistically affected from either the groups nor from the storage period. It has been reported that the value of stickiness and hardness is related to the amount of starch and gelatinization of starch (Sozer, Dalgıç, & Kaya, 2007). It is known that there is a strong relationship between the textural properties and structure of food (Aguilera & Stanley, 1999).

The cacao muffins prepared with different formulations were evaluated by sensory analysis by panelists. The data on the sensory variability properties were determined separately. Sensory analysis data of crust colour, crust thickness,

crumb colour, porosity, elasticity, humidity, taste, odour, swallowability, mouthfeel and overall acceptability of the products are given in Table 6.

Experienced panelists performing sensory analyses of the produced cacao muffins indicated that the control group and the 2.5% reduced products were acceptable, it has been seen that with the increase of the substitution ratio, the outer crust colour of caking has been removed from the acceptability, the similar situation for the crumb colour of cacao muffins. The mixing ratio affecting the taste of the crumb and outer colours of the cacao muffins did not affect the thickness and elasticity of the cacao muffins crust statistically. The panelists could not detect a statistical difference in the porosity of the products prepared with grape seed substitute, the photographs of the interior of the cacao muffin in Figure 2 already support this situation. As well as the increase in the substitution rate, the humidity, odour, mouth feel and overall acceptability of the cacao muffins has moved away from its acceptability, and even 10% substituted cacao muffins are the least admissible in the mouth. Substitution ratio did not statically effect of taste and swallowability in cacao muffins.



Control 2,5% reduced 5% reduced 10% reduced

Figure 1. Outer profiles of cacao muffins

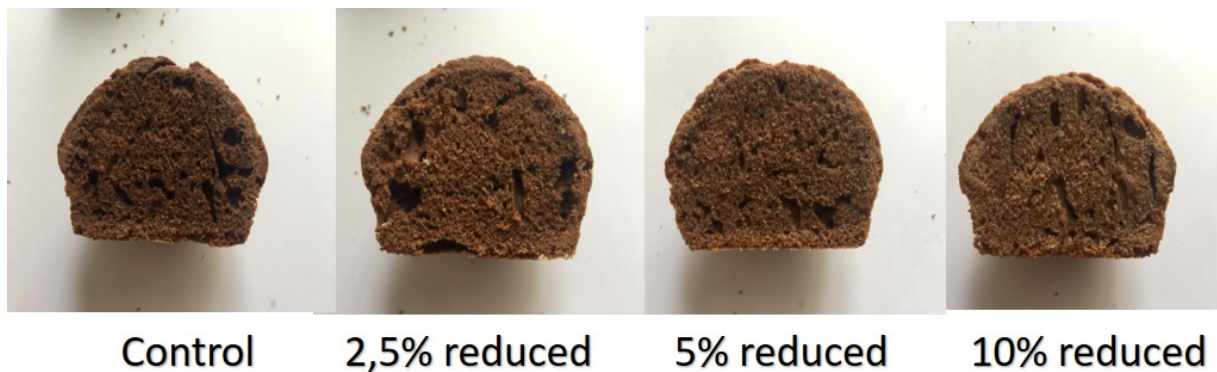


Figure 2. Crumb profiles of cacao muffins

Table 5. Hardness, adhesiveness, resilience, cohesiveness, gumminess and chewiness values of cacao muffins produced with grape seed powder

Days	Groups	n	Hardness (N)	Adhesiveness	Resilience	Cohesiveness	Gumminess (N)	Chewiness (J)
1 day	Control	3	10.59±0.28 ^{abZ}	0.00±0.00 ^{aX}	0.92±0.00 ^{aX}	0.60±0.01 ^{aX}	6.43±0.15 ^{aZ}	5.97±0.19 ^{aX}
	2.5% Reduced	3	9.80±0.15 ^{bZ}	0.00±0.00 ^{aX}	0.92±0.00 ^{aX}	0.61±0.00 ^{aX}	6.01±0.07 ^{aZ}	5.54±0.09 ^{aZ}
	5% Reduced	3	10.22±0.32 ^{abZ}	0.00±0.00 ^{aX}	0.92±0.00 ^{aX}	0.58±0.00 ^{aX}	5.99±0.25 ^{aZ}	5.52±0.23 ^{aZ}
	10% Reduced	3	10.80±0.23 ^{aZ}	0.00±0.00 ^{aX}	0.91±0.00 ^{aX}	0.59±0.00 ^{aX}	6.39±0.21 ^{aZ}	5.88±0.20 ^{aY}
3 days	Control	3	19.16±0.94 ^{aY}	0.00±0.00 ^{aX}	0.89±0.00 ^{aY}	0.56±0.00 ^{aY}	10.86±0.54 ^{aY}	9.71±0.52 ^{aY}
	2.5% Reduced	3	15.48±0.43 ^{bY}	0.00±0.00 ^{aX}	0.89±0.00 ^{aY}	0.53±0.00 ^{abY}	8.35±0.19 ^{bY}	7.51±0.18 ^{bY}
	5% Reduced	3	14.82±0.42 ^{bY}	0.00±0.00 ^{aX}	0.89±0.00 ^{aY}	0.52±0.02 ^{bY}	7.82±0.51 ^{bY}	6.97±0.42 ^{bY}
	10% Reduced	3	15.76±0.53 ^{bY}	0.00±0.00 ^{aX}	0.88±0.00 ^{aY}	0.50±0.00 ^{bY}	7.93±0.40 ^{bY}	7.00±0.34 ^{bY}
5 days	Control	3	23.89±0.71 ^{aX}	0.00±0.00 ^{aX}	0.86±0.00 ^{aZ}	0.51±0.00 ^{aZ}	12.28±0.42 ^{aX}	10.64±0.40 ^{aY}
	2.5% Reduced	3	20.87±0.64 ^{bX}	0.00±0.00 ^{aX}	0.87±0.00 ^{aZ}	0.52±0.00 ^{0aY}	10.93±0.25 ^{abX}	9.52±0.18 ^{abX}
	5% Reduced	3	20.53±0.71 ^{bX}	0.00±0.00 ^{aX}	0.86±0.00 ^{aZ}	0.48±0.00 ^{bY}	9.94±0.46 ^{bX}	8.60±0.47 ^{abX}
	10% Reduced	3	22.32±0.67 ^{abX}	0.00±0.00 ^{aX}	0.86±0.00 ^{aY}	0.48±0.00 ^{bY}	10.86±0.49 ^{abX}	9.44±0.46 ^{bX}

Data were averages of three different samples ± standard deviation. Values followed by different letters in each column indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatments. Percentage based on the total weight of flour, sugar, and oil (2.5, 5 and 10%) from the cacao muffin components. instead of the reduced value added grape seed powder. The letters X, Y, Z show the difference between the days. a, b, letters indicate the difference between the groups.

Table 6a. Sensory analysis data of crust colour, crust thickness, crumb colour, porosity, elasticity, humidity, taste, odour, swallowability, mouth feel and overall acceptability of the products.

	n	Crust colour	Crust thickness	Crumb colour	Porosity	Elasticity
Mix Ratio						
Control	10	8.33±0.47 ^a	7.00±0.40 ^a	8.44±0.41 ^a	6.55±0.44 ^a	5.77±0.46 ^a
2.5% Reduced	10	7.33±0.28 ^{ab}	6.66±0.47 ^a	7.33±0.33 ^a	5.89±0.53 ^a	6.44±0.53 ^a
5% Reduced	10	6.11±0.35 ^b	6.55±0.64 ^a	5.66±0.50 ^b	5.77±0.70 ^a	6.77±0.49 ^a
10% Reduced	10	4.33±0.60 ^c	6.33±0.74 ^a	3.88±0.65 ^c	5.00±0.97 ^a	6.44±0.47 ^a
P		**	-	**	-	-

Data were averages of three different samples ± standard deviation. Values followed by different letters in each column indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatments. Percentage based on the total weight of flour, sugar, and oil (2.5, 5 and 10%) from the cacao muffin components. instead of the reduced value added grape seed powder.

Table 6b. Sensory analysis data of crust colour, crust thickness, inner colour, porosity, elasticity, humidity, taste, odour, swallowability, mouth feel and overall acceptability of the products.

	n	Humidity	Taste	Odour	Swallowability	Mouthfeel	Overall acceptability
Mix Ratio							
Control	10	5.89±0.65 ^b	6.55±0.72 ^a	6.66±0.78 ^a	5.66±0.62 ^a	6.22±0.66 ^a	7.00±0.68 ^a
2.5% Reduced	10	6.22±0.59 ^b	6.77±0.68 ^a	6.33±0.70 ^a	6.33±0.44 ^a	6.22±0.61 ^a	7.00±0.37 ^a
5% Reduced	10	6.66±0.62 ^a	6.66±0.28 ^a	5.88±0.61 ^b	6.66±0.50 ^a	5.66±0.66 ^b	6.33±0.44 ^b
10% Reduced	10	6.88±0.53 ^a	6.55±0.41 ^a	5.77±0.64 ^b	6.22±0.61 ^a	4.77±0.77 ^c	5.77±0.57 ^b
P	-	-	-	-	-	-	-

Data were averages of three different samples ± standard deviation. Values followed by different letters in each column indicated significant differences ($p < 0.05$) among different treatments. Percentage based on the total weight of flour, sugar, and oil (2,5, 5 and 10%) from the cacao muffin components, instead of the reduced value added grape seed powder.

Conclusion

Cacao muffin is a bakery product widely produced and consumed by consumers all over the world. but thanks to the high sugar, fat, and flour it contains, it is in the class of high-calorie foods. The aim of this study is to remove the oil, sugar and flour content of the cacao muffin from the mixture at varying proportions and replace the removed part with grape seed powder. In some bakery products, it is not possible to completely remove oil, sugar and flour from the prescription due to the function of the oil. By using components that have functional characteristics in the production of baked goods, consumption of these foods and components that have beneficial effects on human health can be provided to participate in the human diet. As a result of the study, it was observed that the grape seed powder supplementation did not affect the volume properties of the cacao muffins. on the contrary, decreased the baking loss, and the products replaced with grape seeds powder have been opened in both interior and exterior colours. It can be said that the product group which is closest to the control in respect of the textural properties is the products produced with 2.5% substitution. Functionality has been added to the products produced at this site, and calories are reduced, in addition, grape seeds, which are the wine sector waste, are prevented from being economically lost in this way. On the other hand, the theoretical calorie reduction between 0.98% and 4.12% was achieved in cacao muffins.

References

- Aguilera, J.M., Stanley, D.W. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering*: Springer Science & Business Media. ISBN-13: 9780834212565
- Altuğ, T., Elmacı, Y. (2005). *Gıdalarda duyuşal değerlendirme. Meta Basım Matbacılık Hizmetleri. İzmir*. ISBN 9944566087
- Arvanitoyannis, I.S., Ladas, D., Mavromatis, A. (2006). Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(5), 475-487.
- Bath, D., Shelke, K., Hosene, R. (1992). *Fat replacers in high-ratio layer cakes. Cereal foods world (USA)*.
- BeMiller, J., Whistler, R., Carbohydrates, F.O. (1996). *Food Chemistry*: Marcel Dekker. New York. Basel. Hongkong. ISBN-13: 9780824763503
- Bozhüyük, A., Özcan, S., Kurdak, H., Akpınar, E., Saatçı, E., Bozdemir, N. (2012). Sağlıklı yaşam biçimi ve aile hekimliği. *Turkish Journal of Family Medicine and Primary Care*, 6(1), 13-21.
- Committee A.A. o. C.C.A.M. (1983). *Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists* (8 ed. Vol. 1): Amer Assn of Cereal Chemists. ISBN-13: 9780913250310
- Coşkun, T. (2005). Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 48(1), 61-84.
- Çelik, İ., Kotancılar, H.G. (1995). Kimyasal Kabartıcılar Ve Fırın Ürünlerindeki Fonksiyonları. *Atatürk Üniversitesi. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26(3), 451-459.
- Çelik, T.E. (2012). *Enzimatik interesterifikasyon yöntemi ile geliştirilen zeytinyağı bazlı yağ ürünlerinin kek ve*

- bisküvi yapımında kullanılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Ankara.
- Dizlek, H., Özer, M.S., Gül, H. (2008). *Keklerin Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Ölçütler* Paper presented at the Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Ekici, L., Ercoskun, H. (2007). Et ürünlerinde diyet lif kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1, 83-90.
- Kaçar, D. (2010). *Kimyasal interestifikasyon yöntemi ile zeytinyağı bazlı yeni bir yağ ürününün geliştirilmesi ve kek-bisküvi üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Ankara.
- Karaoglu, M.M., Kotancılar, H.G., Gerçekaslan, K. E. (2008). The effect of par-baking and frozen storage time on the quality of cup cake. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(10), 1778-1785.
- Karaoğlu, M.M. (1998). *"Farklı yöntemler uygulanarak elde edilmiş modifiye nişastaların kek kalitesi üzerine etkileri"*. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi), Erzurum.
- López-Miranda, S., Serrano-Martínez, A., Hernández-Sánchez, P., Guardiola, L., Pérez-Sánchez, H., Fortea, I., Gabaldón JA, Núñez-Delgado, E. (2016). Use of cyclodextrins to recover catechin and epicatechin from red grape pomace. *Food Chemistry*, 203, 379-385.
- Malek, S. (2013). *"Kavrulmuş buğday ve arpadan elde edilen unların kek kalitesi üzerine etkisi"*. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi). Erzurum.
- Martinez-Cervera, S., Salvador, A., Sanz, T. (2014). Comparison of different polyols as total sucrose replacers in muffins: Thermal, rheological, texture and acceptability properties. *Food Hydrocolloids*, 35, 1-8.
- Martinez-Cervera, S., Salvador, A., Sanz, T. (2015). Cellulose ether emulsions as fat replacers in muffins: Rheological, thermal and textural properties. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1083-1090.
- Meral, R., Doğan, İ.S. (2009). Fonksiyonel öneme sahip doğal bileşenlerin unlu mamullerin üretiminde kullanımı. *Gıda Dergisi*, 34(3), 193-198.
- Mercan, N., Boyacıoğlu, H., Boyacıoğlu, D. (2000). Kek kalitesi üzerine bazı emülgatörlerin etkilerinin araştırılması. *Gıda*, 6, 75-81.
- Mete, H.E. (2008). Kronik hastalık ve depresyon. *Klinik Psikiyatri*, 11, 3-18.
- Özer, M.S., Dizlek, H., Kola, O., Altan, A. (2004). Değişik Gaz Salınımı Hızlarına Sahip Kabartma Tozlarının Pandispanya Tipi Keklerin Nitelikleri Üzerindeki Etkileri. *Gıda*, 29(1), 43-50.
- Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S., Yamaji, N. (1998). Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1460-1464.
- Seçen, S.M. (2016). *Kabak Çekirdeği Yağının Kek Üretiminde Kullanım Olanaklarının Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Nevşehir.
- Seyhun, N., Şümmü, G., Şahin, S. (2004). Farklı Nişasta ve Emülgatör Çeşitlerinin ve Yağ Miktarlarının Mikrodalga ile Pişirilen Keklerin Bayatlaması Üzerindeki Etkileri. *Gıda*, 29(5), 337-343.
- Sozer, N., Dalgıç, A., Kaya, A. (2007). Thermal, textural and cooking properties of spaghetti enriched with resistant starch. *Journal of Food Engineering*, 81(2), 476-484.
- Wang, Z., Zhou, J., Xu, X., Perl, A., Chen, S., Ma, H., (2017). Adoption of table grape cultivars: An attribute preference study on Chinese grape growers. *Scientia Horticulturae*, 216, 66-75.
- Yıldız, Ö. (2010). *"Farklı formülasyon, pişirme ve depolama sürelerinin glutensiz kek kalitesi üzerine etkilerinin araştırılması"*. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi), Van.



GIDA TAKVİYELERİ VE SAĞLIK ÜZERİNE ETKİLERİ

Derya Atalay , Hande Selen Erge 

Cite this article as:

Atalay, D. Erge, H.S. (2018). Gıda Takviyeleri ve Sağlık Üzerine Etkileri. Food and Health, 4(2), 98-111. DOI: 10.3153/FH18010

Abant İzzet Baysal Üniversitesi,
Mühendislik Mimarlık Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, Gölköy
Kampüsü, Bolu, Türkiye

ÖZ

Gıda takviyeleri, bir insanın diyetinde desteklemek üzere kullanılan ve vitaminler, mineraller, amino asitler, bitkiler ya da bitkisel diyet bileşenleri gibi besin öğelerini içeren ürünler olarak tanımlanmaktadır. Gıda takviyelerinin kullanımı başarılı satış stratejileri, reklamlar ve internet nedeniyle yaygındır. Gıda takviyelerinin üretimi tablet ve kapsül üretimleri ile benzerlikler göstermektedir. Üretimdeki başlıca basamaklar; reçete oluşturma, karıştırma, öğütme, granülasyon, kurutma, son karıştırma, tablet yapma, tableti presleme, kaplama ve kapsülleme aşamalarıdır. Gıda takviyelerinin üretiminde meyve ve sebzeler, bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvansal kaynaklı hammaddeler kullanılmaktadır. Gıdaların insan sağlığı üzerine faydalı özellikleri (antioksidan, besinsel lif vb.) bilindiğinden dolayı günümüzde gıda takviyelerinin tüketimi artmaktadır. Gıda takviyelerinde en fazla gözlenen sorunlar kontaminasyon, katkı maddeleri, toksisite, yanlış doz ve yanlış etiketlemedir. Son zamanlarda ilaç interaksyonlarından kaynaklı yan etkilerin yanında söz konusu ürünlerle ilgili zehirlenmeler ülkemizde ve dünyada görülmektedir. Gıda takviyelerinin ilaç olarak değerlendirilmesi gerektiği ancak doğru şekilde tüketildiğinde insanların sağlığını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gıda takviyeleri, Takviye üretimi, Gıda bileşenleri, Sağlık

ABSTRACT

DIETARY SUPPLEMENTS AND THEIR EFFECTS ON HEALTH

Dietary supplement is defined as “a product that is used by man to supplement the diet and contains dietary ingredients such as vitamins, minerals, amino acids, herbs or other botanical dietary substances”. Using of dietary supplement is widespread because of successful marketing strategies, advertising and internet information sources. The main steps of supplement production are formulation, blending, milling, granulation, drying, final blending, tableting, tablet press tooling, coating, and encapsulation. Fruits and vegetables, plants, microorganisms and animal origin as raw material are used in production of dietary supplements. Since, beneficial properties of foods on human health are known; consumption of food supplements is increased in recent years. The most common problems observed in dietary supplements are the risk of contamination, additives, toxicity, and standardization of dose and accuracy of labeling. Direct intoxications related with these products as well as adverse effects due to drug interactions are observed recently in Turkey and World. It is known that dietary supplements should not be considered as medicine, but when are consumed correctly, positively affect the health of humans.

Keywords: Dietary supplements, Supplement production, Food components, Health

Submitted: 12.07.2017

Accepted: 18.10.2017

Published online: 20.01.2018

Correspondence:

Derya ATALAY

E-mail: dervaatalay@ibu.edu.tr

©Copyright 2018 by ScientificWebJournals

Available online at

www.scientificwebjournals.com

Giriş

Bitkiler ve bitkilerden elde edilen ürünlerden, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kayıtlarına göre; dünya nüfusunun büyük bir kısmının (% 70-80), hastalık tedavisinde ve hastalıktan korunmada “geleneksel tıp” adı altında yararlandığı belirtilmektedir. Tıbbi bitki türünün 70.000 civarında olduğu ileri sürülmekle birlikte; Dünya Sağlık Örgütü tarafından 21.000 bitki türünün ilaç hazırlamak için uygun bulunduğu bildirilmektedir (Lange, 1998; Ersöz, 2012).

Tıbbi bitkilerin genellikle Uzakdoğu ülkelerindeki toplumlarda yaygın olduğu; son yıllarda batı toplumlarında da sıklıkla kullanıldığı ve giderek arttığı bilinmektedir. Bu bitkiler çoğunlukla “alternatif tıp” veya “tamamlayıcı tıp” adı altında kullanılmakta ve sağlığın geliştirilmesi ve sağlığa yararlı olabilmesi amacıyla yıllardır kullanılan bitkisel tıbbi ürün ticaretinde sürekli yükselen bir pazar olmasına da sebep olmaktadır (Coppens *vd.*, 2006; Ersöz, 2012). İnsanlar, bitkisel ürünleri uzun yıllardır kullanmaktadır. “Gıda Takviyeleri” olarak tanımlanan bu ürünlerden oluşan pazar değeri, tüm dünyada 2000’li yılların başında 50.6 milyar dolarlık bir rakama ulaşmıştır. Bu rakam, toplamda 60 milyar dolar olan bitkisel ürünler pazarının % 80’inden fazlasını oluşturmaktadır. Bu pazar payında farklı ürün gruplarının dağılımı vitamin ve mineraller, bitkisel droglar, spor ve zayıflama ürünleri için sırasıyla % 40, % 39 ve % 21 olarak belirlenmiştir (Ersöz, 2012).

Gıda takviyeleri, “Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği”nde; normal beslenmeyi takviye etmek amacıyla; vitamin, mineral, protein, karbonhidrat, lif, yağ asidi, amino asit gibi besin öğelerinin veya bunların dışında besleyici veya fizyolojik etkileri bulunan bitki, bitkisel ve hayvansal kaynaklı maddeler, biyoaktif maddeler ve benzeri maddelerin konsantre veya ekstraktlarının tek başına veya karışımlarının kapsül, tablet, pastil, tek kullanımlık toz paket, sıvı ampül, damlalık şişe ve diğer benzeri sıvı veya toz formlarda hazırlanarak günlük alım dozu belirlenmiş ürünler olarak tanımlanmaktadır (Anonim, 2013).

1994 yılında ABD Senatosu tarafından kabul edilen “Besin Destekleri Sağlık ve Eğitim Yasası” (The Dietary Supplement Health and Education Act - DSHEA) gıda takviyelerini, diyeti desteklemek üzere kullanılan bir veya daha fazla besin ögesini (mineraller, vitaminler, amino asitler ve bitkisel droglar) içeren ağızdan alınmak üzere tablet, kapsül ve sıvı formda hazırlanmış ürünler olarak nitelendirmektedir (Halsted, 2003; Tek & Pekcan, 2008; McWhorter, 2009; Geller *vd.*, 2015; Rautiainen *vd.*, 2016). DSHEA; gıda takviyelerini, ilaçtan çok ‘gıdalar’ genel adı altında kategorize etmektedir (McWhorter, 2009). Ayrıca, gıda takviyelerinin performans artırma, kozmetik amaçlı veya dengeli beslenmeyi sağlama, bağışıklık sistemini kuvvetlendirme ve bazı

hastalıkları iyileştirme gibi amaçlarla kullanıldığı belirtilmektedir (Petroczi *vd.*, 2011; Soare *vd.*, 2014; Rautiainen *vd.*, 2016).

Gıda takviyelerinin kullanım yaygınlığı ve sıklığı son yıllarda artmaktadır. 2001 yılında yapılan bir çalışmada rastgele seçilen 376 yetişkin arasından % 61.2’sinin gıda takviyesi kullandığı; bu hastaların bazılarının doktorundan aldığı tavsiye üzerine; çoğunun ise ailesi, arkadaşı ya da internet aracılığıyla gıda takviyesini kullandığı bildirilmektedir (Harnack *vd.*, 2001). Durante ve diğerleri (2001) tarafından yapılan çalışmaya göre; 118 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada da vitamin, mineral ya da bitkisel desteklerin kullanımının kadınlarda % 73; erkeklerde % 44 olarak tespit edildiği ve kullanıcıların yaşları 50’nin altında olanların % 70’inin, yaşları 50’nin üzerinde olanların % 26’sının doktorlarının haberi olmadan gıda takviyelerinden yararlandığı belirtilmektedir. Özellikle genç hastaların gıda takviyelerini, doktor tarafından önerilen ilaçları kullanmaktan daha güvenli ve etkili bulduğu saptanmıştır. Gıda takviyelerinin kullanımını özellikle son yıllarda satış stratejileri, reklamlar ve internet aracılığıyla yaygın ve popüler bir hale geldiği bilinmektedir (Halsted, 2003).

Amerika’da gerçekleştirilen bir araştırmada, yetişkinlerin yarısının bir veya daha fazla gıda takviyesi kullandığı belirtilmektedir. Gıda takviyesi kullanan kişilerin; yaşlı, düşük vücut kütle indeksine sahip, fiziksel olarak aktif, sigara kullanım oranı düşük, eğitim ve sosyoekonomik durumunun iyi olduğu aktarılmaktadır (Bailey *vd.*, 2013; Dickinson *vd.*, 2014). Bailey ve diğerleri (2013) tarafından yapılan bir çalışmada Amerika’da gıda takviyesi kullanım amaçlarını araştırmak için 20 yaş üstü yaklaşık 12.000 kişiyle çalışıldığı bildirilmektedir. Kadınların kemik sağlığı için kalsiyum takviyesi kullandığı (% 36), erkeklerin ise kalp sağlığı ya da kolesterol düşürmek (% 18) için takviye tercih ettiği aktarılmaktadır. 60 yaş üstü yetişkinlerin kalp, kemik, eklem ve göz sağlığı için gıda takviyesi kullandığı belirtilmektedir. Takviyelerin sadece % 23’ünün sağlık hizmetleri uzmanı tarafından önerildiği, en çok tercih edilen ürünlerin multivitamin-mineral olduğu, bunu da kalsiyum ve omega 3-balık yağının takip ettiği bildirilmektedir. Yine yapılan bir çalışmada, gıda takviyelerinin sağlık desteği sağlaması ve beslenme eksiklerini tamamlaması gibi amaçlar için kullanıldığı aktarılmaktadır (Dickinson *vd.*, 2014).

Yapılan araştırmalarda, kullanım/tüketim miktarı en fazla olan gıda takviyelerinin mineral içerikli veya mineral içerikli olmayan multivitaminler olduğu aktarılmaktadır (Tek & Pekcan, 2008; Rautiainen *vd.*, 2016; Ergen & Bozkurt Be-

koğlu, 2016). Ülkemizde de en çok kullanılan takviye grubunun vitaminler ve vitamin-mineral komplekslerinden oluştuğu bildirilmektedir (Tek & Pekcan, 2008).

Bu derlemede; son yıllarda dikkat çeken, talep gören ancak bilgi eksikliği olduğu düşünülen gıda takviyeleri, üretimi, içeriğindeki gıdalar ve/veya bileşenleri, sağlık üzerindeki olumlu ve olumsuz etkileri ile ilaç interaksyonları gibi konuların değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

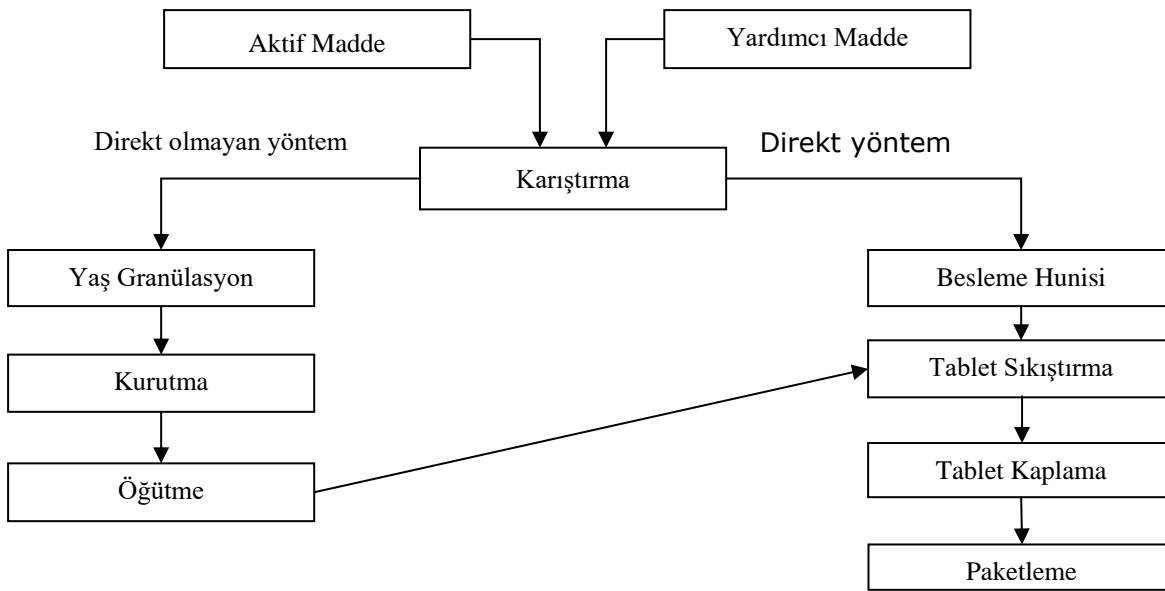
Gıda Takviyelerinin Üretimi

Gıda takviyelerinin üretimi genel olarak sırasıyla; reçete oluşturma, karıştırma, öğütme, granülasyon, kurutma, son karıştırma, tablet yapma, tableti presleme, kaplama ve kapsülleme aşamalarından oluşmaktadır (Tousel, 2015). Üretim açısından ilaç sektöründe tablet ve kapsül üretimi ile benzerlikler gösterdiği bilinen gıda takviyelerinin tablet halindeki üretimi aşağıdaki akış diyagramında verilmiştir (Şekil 1).

Tabletler, kuru toz bileşenlerin karıştırıldıktan sonra doğrudan baskı formülü denilen ve üretimde en çok kullanılan, en az maliyetli yöntem ile sıkıştırılmasıyla elde edilmektedir. Tablet üretiminde, toz bileşenlerin diğer bileşenlerle karışabilmesi ve bu karışıma düzgün bir akışın kazandırılması, ka-

rışımın sıkıştırılması ve tablet baskısından çıkabilmesi özellikleri ön plana çıkmaktadır. Ayrıca üretilen tabletin uflanma özelliğinin iyi; çözünabilir özelliğinin hızlı olması gerektiği belirtilmektedir (Bodhmag, 2006; Tousel, 2015).

Birinci aşama olan reçete oluşturmada; hangi aktif bileşenler ve/veya yardımcı maddelerin kullanılacağına karar verilmektedir. İkinci aşama olan granülasyon yaş ve kuru olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir. Yaş granülasyon işlemi; toz içerikler, baskılanamadığında ve sistemdeki akışı yeterli olmadığında tablet özelliği oluşmadığından yapıda yumuşama ve dağılma gözlemlendiği durumlarda kullanılmaktadır. Bu durumda partiküllerin bir araya gelebilmesi için bir *bağlayıcıya* ihtiyaç duyulmaktadır. Bağlayıcı, suya ya da bir çözücüye eklenerek toz üzerine spreyleneirse, bu işlem yaş granülasyon işlemi olarak adlandırılmaktadır. Yaş granülasyon yapılacaksa kurutma işleminin uygulanması gerektiği belirtilmektedir. Kurutma işlemi 24-72 saat arasında sürebilmektedir. Kuru granülasyon işleminin prensibinde ise; neme, ısıya veya her iki faktöre de duyarlı olan toz bileşenlerin, önceden öğütülmüş kuru bağlayıcılarla karıştırılması yer almaktadır. Kuru granülasyon işlemi yoğunlaşan ve sıkıştırılan toz bileşenlere mekanik güç uygulaması olarak tanımlanmaktadır.



Şekil 1. İlaç endüstrisine ait tablet üretimi akış diyagramı (Bodhmag, 2006)

Figure 1. Flow chart of pharmaceutical tablet production (Bodhmag, 2006)

Öğütülen karışıma, kurutmayı güçlendirme ve partikül büyüklük dağılımını sınırlandırma gibi özellikler kazandırıldıktan sonra presleme basamağına geçilmektedir. Presleme; akış, püskürtme ve baskılama en önemli aşamalarıdır. Tablet yapımında, genellikle kaplama işlemine de ihtiyaç duyulmaktadır. Kaplama işlemi tableti daha sert ve dayanıklı hale getirmekte, tadını geliştirmekte, renk katmakta ve daha rahat tutulmasını ve paketlenmesini sağlamaktadır. Kaplama işlemi, uygun solüsyonun tablet üzerine spreyleneşmesi ile gerçekleştirilmektedir. Su bazlı solüsyon spreylendikten sonra kurutma uygulanmaktadır. Kapsülleme işlemi için genellikle birden fazla farklı ürünü doldurma yeteneğine sahip kapsül makinesine gerek duyulmaktadır. Tozlar, granüller ve sıvılar iki parçalı kapsülün içine doldurulmakta ve üretime sunulmaktadır (Tousel, 2015).

Gıdalar ve/veya Bileşenlerinin Gıda Takviyesi Olarak Kullanımı Üzerine Çalışmalar

Gıdaların insan sağlığı üzerine faydalı özellikleri (antioksidan, besinsel lif vb.) bilindikçe, günümüzde bu faydalı özellikleri içeren gıda takviyelerinin de insan vücuduna olan etkisi sebebiyle tüketimi artmaktadır. Özellikle meyve ve sebzelerde bulunan antosiyaninler ve fenolik maddeler gibi antioksidanlar; tahıllarda bulunan besinsel lifler ve süt proteinleri gibi gıda bileşenlerinin sağlık üzerine pozitif etkileri bilinmektedir. Gıda takviyesi olarak bu bileşenlerin ya da gıdaların kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşmakta ve diyeteye yardımcı olmaktadır. Bu bölümde farklı gıdalar ve bileşenler üzerine yapılan çalışmalar ve bu çalışmalar sonucunun takviye edici gıdalara etkisi üzerinde durulacaktır.

Günümüzde kalp hastalıkları ve kanser, ölüme yol açan iki önemli rahatsızlık olarak bilinmekte ve oksidatif stresin bu hastalıkları tetikleyen önemli faktörlerden biri olduğu belirtilmektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve antioksidan savunması arasındaki dengeyi bozmakta ve oksidatif zarara yol açmaktadır. Bu sorun, antioksidan savunma mekanizmasının eksikliğinden kaynaklanabileceği gibi reaktif oksijen türlerindeki artıştan ve aşırı aktivasyondan kaynaklanabilmektedir. Antioksidan, oksidasyonu engelleyici ya da geciktirici bir madde olarak tanımlanmaktadır (Li *vd.*, 2006; Wolfe & Liu, 2007). ROT, vücutta bulunan antioksidanlara ek olarak, sebze ve meyvelerde bulunan fenolik bileşikler, karotenoidler ve vitaminler gibi dış kaynaklı antioksidanlar tarafından da inaktif hale getirilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, bu bileşenleri içeren gıdaların tüketimi sonunda vücutta koruyucu antioksidanların arttığını göstermektedir. Ayrıca; başta meyve sebze olmak üzere gıdalardaki bu bileşiklerin kardiyovasküler hastalıklar ve belli kanser tipleri ile nega-

tif ilişki gösterdiği bilinmektedir. Bununla birlikte felç, Alzheimer hastalığı ve katarakt gibi hastalıkların da riskini azalttıkları ve bu hastalıkların oluşumunu engellediği belirtilmektedir (Escrig *vd.*, 2001; Liu, 2003; Li *vd.*, 2006; Wolfe & Liu, 2007).

Dünya Sağlık Örgütü, her gün sebze ve/veya meyvenin en az beş porsiyon tüketilmesi gerektiğini önermektedir. Meyve ve sebzelerin tüketiminin artması vücuda alınan antioksidan vitaminler ve diğer bileşenlerin alımını artırmaktadır. Günde beş porsiyon meyve tüketimine alternatif olarak son zamanlarda bazı üreticiler, antioksidanların günlük alım miktarını artırmayı amaçlayan gıda takviyelerini ileri sürmektedir (Chambers *vd.*, 1995; Schieber *vd.*, 2001). E ve C vitaminleri gibi bilinen antioksidanların karışımlarını içeren takviyeleri kullanmanın faydaları birçok çalışma ile değerlendirilmektedir. Ancak gıdaların tamamı ya da bir kısmının ekstraktlarını içeren formülasyonlar da mevcuttur. Bu formülasyonlar “ekstranütrientler” olarak sınıflandırılmaktadır. Ekstranütrientler, diyetin biyoaktif vitamin olmayan bileşenleridir ve bitkisel koruyucular ya da koruyucu faktörler olarak da adlandırılmaktadır (Chambers *vd.*, 1995).

Son çalışmalar; antioksidan kaynağı olarak diyeteye askorbik asit alımının artması gerektiğini göstermektedir. Askorbik asit (C vitamini) alımını artıran diğer bir yol da takviye tablet alımıdır. Leonard ve diğerleri (2002) tarafından yapılan çalışmaya göre; askorbik asit içeren taze meyve ve sebze sularının ROT inaktivasyonunda etkili olduğu belirtilmektedir. Diğer serbest radikal yakalayıcılar çok çeşitli meyve ve sebzede bulunmaktadır. Flavonoidler, karotenoidler, organik asitler, E vitamini ve sülfidril bileşikler bu bileşikler arasında yer almaktadır. Bu sonuçlar, meyve ve sebze tüketiminin antioksidan açısından takviye alımından daha iyi olduğunu ileri sürmektedir. Bu çalışma; meyve ve sebzelerin birçoğunun OH ve oksijen radikallerine karşı antioksidan kapasitesine sahip olduğunu ve bu radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonunu engellediğini belirtmektedir. Diyeteye meyve ve sebzelerin düzenli tüketiminin hücre ve doku zedelenmelerine karşı pozitif etki gösterdiği de aktarılmaktadır.

Gıda takviyelerinin üretiminde kullanılan farklı kaynaklara ilişkin örnekler aşağıda verilmektedir.

Juice Plus

Juice Plus adı ile bilinen kapsüllerin yeni tip takviyelere örnek olarak gösterildiği ve sürekli alışveriş yaparak beş porsiyon meyve hazırlamak için vakitleri yetersiz olan bireyler için ideal olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu kapsüllerin meyve ve sebzelerin doğrudan yerini alabileceği ileri sürülmektedir. Juice Plus kapsüllerinin antioksidan aktivitesinin

taze meyve ve sebzelerden farklı olmadığı ileri sürülmektedir (Chambers *vd.*, 1995).

Nar

Nar üzerine yapılan bir çalışmada, narın önemli bir biyoaktif bileşen kaynağı olduğu ve yüzyıllardır geleneksel tıpta kullanıldığı belirtilmektedir. Nar suyunun antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu ve damar tıkanıklığını engelleyici etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Nar kabuğu ve narın etli meyve kısmı üzerine yapılan bir çalışmada toplam fenolik, flavonoid ve proantosiyanidin bileşikler bakımından nar kabuğu ekstraktının daha zengin olduğu bulunmuştur. Kabuk ekstraktındaki fenoliklerin, narın antioksidan özelliğinde önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Böyle bir sonuç gıda endüstrisinde takviye edici gıdaların eldesinde daha çok ekstrakt üretimini akla getirmektedir. Çünkü; ekstrakt, aynı zamanda bir antioksidan kaynağı olarak kullanılmaktadır (Li *vd.*, 2006).

Yabani İğde

Yabani iğde gibi bitkilerin hem antioksidan özelliği hem de çoklu doymamış yağ asidi içeriğinin kardiyovasküler hastalıklar açısından önemli olduğu bilinmektedir. Gerekli antioksidanların ve yararlı bileşiklerin insan vücuduna her gün alınması zor olduğundan gıda takviyelerinin tüketimi kolay olmakta ve son zamanlarda antioksidan bakımından zengin bitkilerin gıda takviyesi olarak kullanımı giderek artmaktadır. Son zamanlarda, meyve suyu konsantrelerinin antioksidan katkısı olarak tüketimi teşvik edilmeye çalışılmaktadır. Ancak; bazı meyve sularının acı ve asidik tadı ve gastrointestinal intoleransı gibi sebepler konsantre olarak kullanımını azaltmaktadır. Yabani iğde suyu, C vitamini bakımından da zengin bir meyvedir. Ancak; tokoferol, tokotrienol, karotenoid ve flavonoid gibi diğer antioksidanlar az miktarda bulunmaktadır (Eccleston *vd.*, 2002).

Guava

Bitkisel gıdaların besinsel lif ve antioksidan içeriği kronik ve dejeneratif hastalıkların engellenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Antioksidan aktiviteye sahip C ve E vitaminleri gibi fitokimyasalları içeren guava, taze tüketimi yanında içecek, dondurma ve reçel olarak tüketilen tropik bir meyvedir. Guavanın etli meyve kısmı ve kabuğunun besinsel lif, polifenoller açısından zengin olduğu ve önemli bir antioksidan kaynağı olabileceği belirtilmektedir. Bu gibi sebepler guavanın gıda takviyelerinde kullanılmasında tercih edilmesini sağlamaktadır (Escrig *vd.*, 2001).

Yaban Mersini

Antosiyaninler, meyve ve çiçeklere parlak ve çekici renkler veren antosiyanidinlerin glikosidik formlarıdır. Meyvelerde bulunan büyük moleküllü antosiyaninler, genellikle siyanidin aglikona bağlıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar; antosiyaninlerin antioksidan ve iltihapları önleyici bileşikler olarak sağlık faydalarını ortaya koymaktadır. Örneğin; üzümü meyvelerde antioksidan aktivitenin doğrudan antosiyanin miktarı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Antosiyaninlerin bu iyileştirici faydasının bilinmesi ve onların birçok doğal kaynaktan bulunması antosiyaninlere bitkisel takviye endüstrisinde ilgiyi artırmaktadır. Antosiyanin kaynakları arasında ise; yaban mersini, mürver dutu, kuş kirazı ve vişne sayılmaktadır (Chandra *vd.*, 2001). Yaban mersini, Kuzey Amerika ve Avrupa'da geleneksel tıpta tarih boyunca kullanılmaktadır. Günümüzde ise yaban mersini, farmasötik ve gıda takviyesi olarak damar ve göz hastalıklarında kullanılmaktadır. Yaban mersini flavonoidlerinin antioksidan ve antikanserijenik özelliklerinin bulunduğu ve idrar yolu hastalıklarında faydaları olduğu bilinmektedir. Yaban mersini, kan şekeri düzenleyici etkisiyle de diyabetlilerin tedavisinde kullanılabilir. Yaban mersinindeki antosiyaninler; antioksidan etkisi nedeniyle hastalıkları önleme bakımından önemli bulunmaktadır. Bu gibi etkileri sonucunda da yaban mersini ekstraktlarının gıda takviyesi olarak kullanımının uygun olduğu belirtilmektedir (Kalt & Dufour, 1997).

Zeytin

Zeytin ve zeytin ürünlerinin, içerdikleri fenolikler sayesinde oksidatif dengeyi sağladığı ve bu nedenle de Akdeniz atışı diyetinde önemli bir yer aldığı bildirilmektedir. Hidroksitirozol gibi zeytin fenollerini üzerine çalışmalar sonunda zeytin meyvesi ekstraktı olan "HIDROKS" (HIDROX®) gıda takviyesi üretilmiştir. HIDROX® sulu bir zeytin meyvesi ekstraktıdır ve zeytin pulpu işlemede yan ürünlerin dondurarak kurutulması ile hazırlanan bir tozdur. Bu toz, % 1-2 sitrik asit ve % 6 polifenol içeren % 98-99 düzeyinde katı bir maddedir. Diğer bileşenler protein, karbonhidrat ve yağdır. Polifenoller arasında en fazla hidroksitirozol (% 50-70) bulunmakta, oleuropein % 5-10, tirozol ise % 0.3 düzeyindedir. HIDROX®'un en yüksek dozdaki (2000mg/kg/gün) günlük alımında bile toksisitesinin olmadığı belirtilmiştir (Soni *vd.*, 2006).

Muz

Muz, sindirim sistemi rahatsızlığı olan bireyler üzerinde es-kiden beri gıda takviyesi olarak önerilmektedir. Muzun anti ülser özelliği 1976 yılında kanıtlanmıştır. Muzlardaki en önemli bileşiklerden biri flavonoidlerdir. Bu polifenolik gruptan en önemli olanı ise bir löykoantosiyanin olan flavon

3-4 diol'dür. Flavonoidlerin, iltihap önleyici, tümör oluşumunu inhibe edici ve karaciğeri koruyucu ve gastrik hücrelerde asit salgısını azaltıcı özelliklerinin bulunduğu bilinmektedir. Bir çalışmada; olgunlaşmamış muzdan elde edilen flavonoid ve löykoantosyanidin bakımından zengin ekstraktın aspirinin neden olduğu zarara karşı koruyucu etkisinin bulunduğu saptanmıştır. Gastrik hastalıklarda özellikle flavonoidlerin etkisi belirlendiğinden muz gibi gıdaların da gıda takviyesi olarak kullanımı ile koruyucu etkinin sağlanabileceği ileri sürülmektedir (Lewis *vd.*, 1999).

Probiyotikler

Mideye alındığında sağlık ya da fizyolojik durum üzerine pozitif etki gösteren patojenik olmayan, bağırsak mikrobiyal dengesini geliştiren mikroorganizmalar olarak bilinen probiyotiklerin de, gastrointestinal rahatsızlıkların azaltılmasında yardımcı olduğu bildirilmektedir (Agrawal, 2005; Diop *vd.*, 2008). Probiyotiklerin kombinasyonundan elde edilen Probio-Stick üzerine yapılan çalışmada; karın ağrısı, bulantı ve kusma gibi bulguların azaldığı görülmüştür. Diğer taraftan bu takviyelerin kullanımının stresin tetiklediği kardiyovasküler, fiziksel ve zihinsel rahatsızlıklarda önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Diop *vd.*, 2008).

Soya Tohumu

Bir çalışmada; soya tohumu tozunun *Lactobacillus reuteri* türü ile karıştırılarak sağlık açısından faydalı bir gıda takviyesi olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Soya tohumu tozu *L. reuteri*'nin yaşamını desteklemiştir. Bu takviyede probiyotik olan *L. reuteri*'nin bağırsak sistemindeki faydaları ile soya tohumundaki, β - glikosidik izoflavonlar bir araya getirilmiştir. Kalın bağırsakta bakteri tarafından aglikon izoflavonlar oluşturulmakta ve bu moleküllerin östrojenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmektedir. Bu karışımın tüketiminin östrojenle ilgili çeşitli kanser türlerinin oluşumunu ve kardiyovasküler hastalık riskini azalttığı ileri sürülmektedir (Boever *vd.*, 2001).

Deniz Yosunu

Deniz yosunlarının gıda takviyesi olarak değerlendirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada, deniz yosunlarının yüksek iyot içeriğinden dolayı göğüs kanserine yakalanma oranında azalma olduğu aktarılmaktadır. Diğer gıdalarla kıyaslandığında deniz yosunlarının β -karoten, B₂ vitamini ve mineral açısından zengin olduğu bildirilmektedir (Kolb *vd.*, 2004).

Mango

Besinsel lif; gastrointestinal ve kronik bağırsak hastalıklarını azaltan, bazı kanser tiplerini engelleyen obezite ve diyabet için faydalı olan bir gıda bileşenidir (Rodriguez *vd.*,

2006; Al-Sheraji *vd.*, 2011). Besinsel lif alımı ya gıda takviyeleri ile ya da lifçe zengin gıda tüketimiyle mümkün olmaktadır. Mango pulpu üzerine yapılan bir çalışmada, mangonun önemli düzeyde besinsel lif içerdiği ve lifin yararlı kimyasal ve fizikokimyasal bileşenlerle zengin olduğu bildirilmektedir. Bu özellikler, mango pulpunun özellikle diyetetik, düşük kalorili yüksek lifli gıdalarda ve gıda takviyelerinde nutrasötik etkiyi artırmak amacıyla kullanımını sağlamaktadır (Al-Sheraji *vd.*, 2011). Mangonun haricinde portakal, elma, şeftali ve zeytin gibi birçok meyve ya da biber, enginar ve soğan gibi sebzelerin proses esnasında ayrılan kısımlarının da lifçe zengin olduğu ve fonksiyonel gıda ya da gıda takviyeleri olarak değerlendirilebilecekleri belirtilmektedir (Rodriguez *vd.*, 2006). Ayrıca, besinsel lif takviyelerinin, yüksek kolesterolü kadın ve erkeklerde kan lipit seviyelerinde azalmalar sağladığı ve bu etki sayesinde kan kolesterol seviyesini dengede tuttuğu aktarılmaktadır (Davidson *vd.*, 1998).

Karnabahar, Enginar ve Hindiba

Sebze prosesindeki yan ürünlerin gıdalarda ya da gıda takviyelerinde değerlendirilmesi üzerine yapılan bir çalışmada; karnabahar, enginar ve hindiba sebzeleri kullanılmıştır. Üretim yan ürünleri olan ve pektik polisakarit bakımından zengin karnabaharın üst kökleri, enginar ve hindiba köklerinin gıda takviyesi kaynağı olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir (Femenia *vd.*, 1998).

Sığır Kolostrumu

Gıda takviyesi olarak kullanımı mümkün olabilen sığır kolostrumunun bağırsak zararını ve bağırsaktaki geçirgenliği artırıp kan ve protein kaybını tetikleyen steroid olmayan iltihap önleyici ilaçlara karşı kullanıldığı belirlenmiştir (Playford *vd.*, 1999; 2001). Çünkü iltihap önleyici bu ilaçların gastrointestinal zararlara sebep olabileceği ileri sürülmektedir. Kazein, laktoalbumin ve immunoglobulin açısından zengin olan kolostrum; Amerika, İngiltere ve Avrupa'nın çoğunda gıda takviyesi olarak tüketilmektedir (Playford *vd.*, 1999).

Sağlık Üzerine Çalışmalar

Son yıllarda, takviye edici gıda zincirini geliştirmeye yönelik deneyler ve çalışmalar devam etmektedir. Gıda takviyelerinde birden fazla gıda ya da gıda bileşeni kullanılabilir. Gıda takviyeleri veya gıda takviyesi olmaya uygun gıdalar ile ilgili çalışmalar yukarıda verilmiştir. Bu çalışmaların en önemli sonuçlarından biri de insan sağlığına hangi yönde etki ettiğini belirleyebilmektir.

Diyabet hastaları üzerine yapılan bir çalışmada, diyabetli bireylerin tamamlayıcı ve alternatif tıp (TAM) kullanımının yaygın olduğu sonucuna varılmıştır. TAM, gıda takviyelerini içeren birden çok çalışma alanını kapsamaktadır. Bu kapsamda gıda takviyesi kullanan bireyler sürekli kendi sağlıklarını kontrol ettiklerine inanmaktadır. Çoğu kullanıcı, ilaç olarak tanımlanmayan gıda takviyelerinin yan etkisi olmayacağını düşünmektedir. Ancak, gıda takviyelerinin de yan etkilere ve interaksiyonlara sebep olabileceği unutulmamalıdır. Gıda takviyeleri ilaçlar gibi farmakolojiktir ve doktor veya diyetisyen kontrolünde kullanımı istenmektedir. Bunun sebebi; gıda takviyelerinin kimyasal bileşeninin, yan etkilerinin ya da potansiyel ilaç interaksiyonlarının bilinmesidir (McWhorter, 2009). Yine diyabet hastaları ile gıda takviyeleri üzerine yapılan bir çalışmada, kan glikoz seviyesini düşürücü etkisi olduğu iddia edilen ve satışı yapılabilen çok fazla ürün olduğu tespit edilmiştir. Çoğu diyabetli birey de bu takviyelerin yan etkileri olup olmadığını araştırmamaktadır. Takviyelerin yan etkileri ya da başka bir ilaçla interaksiyonları gibi sorunlar yüzünden doktorlar hastalarını gıda takviyesi kullanımında uyarmalı, açıklayıcı ve destekleyici olmalıdır (Geil & McWhorter, 2008).

Brezilya’da düşük gelirli toplumlardaki gıdasızlık sorununa, kepekli tahıllar, kasava yaprakları, yumurta kabuğu tozu ve susam tohumları karışımıyla oluşturulan bir alternatif gıda takviyesi geliştirilmiştir. Çalışma kapsamında; bu karışımda bulunan protein ve NaCl’ün farelerde kalsiyum ve fosforun biyoyararlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Karışımın vücut ağırlıklarında ve kemiklerdeki kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarında artışa sebep olduğu bulunmuştur. Protein ilave edilmiş bu alternatif gıda takviyesinde, kalsiyum ve fosfor üzerine daha fazla biyoyararlılık gözlenmiştir. NaCl’ün gıda takviyesine ilavesi sonucunda ise kalsiyum ve fosfor üzerine biyoyararlılık değişim görülmemiştir. Sonuç olarak eksik diyetlere eklenen bu karışımın kalsiyum ve fosfor desteği ile biyoyararlılık açısından fayda sağladığı belirlenmiştir (Souza *vd.*, 2002).

Pasiakos ve diğerleri (2015) tarafından yapılan bir çalışmada; atletizm ile ilgilenen ve aktif spor yapan bireylerde protein takviyesi kullanımının kas kütlesi, güç ve fiziksel performans üzerine etkisi incelenmiştir. Protein takviyesi ile birlikte bireylerin kas kütlesinde ve performansında artışın olduğu aktarılmaktadır.

Kreatin, atletizmin her aşamasındaki sporcular tarafından performans geliştirmek, güç ve yağsız kütle kazanmak amacıyla kullanılan çok yaygın bir gıda takviyesidir. Yapılan bir çalışma sonucunda da kaslarda bol miktarda yer alan kreatinin, beyinde de bulunduğu saptanmıştır. Son bulgular kreatinin, iskemik kalp hastalığı ve oksidatif travmaya karşı

önemli bir nörolojik koruma sağladığını göstermektedir. Travmatik beyin hastalıklarından sonra beyin doku zararının üzerine kreatin gıda takviyesinin muhtemel etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, kreatinin zardaki hasarı yaklaşık % 36-50 düzeyinde iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu gıda takviyesinin travmatik hastalıklar sonrasında destek sağladığı, nörolojik koruma gösterdiği bildirilmektedir (Sullivan *vd.*, 2000).

Hayvansal kaynaklı gıda takviyeleri genellikle arı ve ürünleri veya deniz ürünlerinden elde edilen takviyelerdir. Hayvansal kaynaklı gıda takviyelerinden olan balık yağlarının içerdikleri omega-3 yağ asitleri gibi bileşenleri sayesinde kalbi koruduğu, beynin yaşlanma sürecini azaltıcı etkisinin olduğu, çocuklarda zihinsel gelişimi olumlu etkilediği, kansere karşı koruyucu ve önleyici özellikleri taşıdığı çalışmalarda ifade edilmektedir (Güzelsoy & İzgi, 2015; Mol, 2008). İnsanların kanında, hücre ve dokularında bulunan ve enerji kaynağı olan yağ asitleri; hücre, doku ve hormonal metabolizma açısından önemlidir. Hücre yapısı ve fonksiyonlarının, intraselüler sinyalizasyon yolunun ve transkripsiyon faktör aktivitesinin düzenlenmesi, gen ekspresyonu gibi biyolojik aktivitelerde işlevi olan yağ asitleri, insan sağlığı ve hastalık riskleri açısından önemlidir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin takviye veya günlük diyet ile vücuda alınmasının kardiyovasküler hastalıkları önlemede ve özellikle çocuklarda beyin gelişiminde önemli olduğu bildirilmektedir (Calder, 2015).

Harding ve diğerleri (2003) tarafından yapılan çalışmada dikkat eksikliği ve hiperaktivite hastalığı olan çocuklar üzerinde Ritalin™ olarak bilinen ilaç ile gıda takviyeleri kullanımını kıyaslanmıştır. Gıda takviyeleri olarak vitaminler, mineraller, bitkisel gıdalar, aminoasitler, esansiyel yağ asitleri, fosfolipidler ve probiyotikler kullanılmıştır. Bulgular; gıda takviyesinin dikkati geliştirdiğini ve çocuklarda oto-kontrolü iyileştirdiğini desteklemiştir ve Ritalin™’e eşdeğer etkide bulunduğunu göstermiştir.

Buna karşın; gıda takviyesi ve ilaç arasındaki interaksiyonun, ilaç etkisini azaltabileceği veya artırabileceği ya da beklenmeyen yan etkilere sebep olabileceği bildirilmektedir. Örneğin; E vitamini ve aspirin interaksiyonu sonucu antitrombotik etkinin artabileceği aktarılmaktadır. Kalsiyum ve digitoksin/digoksin içeren ilaçların interaksiyonu sonucunda da kardiyotoksit, ritim bozukluğu ve kardiyovasküler rahatsızlık gibi problemlerin oluşabileceği belirtilmektedir (Yetley, 2007). Tablo 1’de gıda takviyesi olarak tüketilen vitamin ve minerallerin ilaçlarla interaksiyonları görülmektedir.

Yine gıda takviyesi kullanımı üzerine yapılan bir derlemede, sporcuların rutin olarak aldığı demir takviyesinin, toksisiteye sebep olduğu aktarılmaktadır. Takviyelerin, gıda alımı sınırlandığında ya da vücutta eksiklikler görüldüğünde kısa süreli kullanımı önerilmektedir. Gıda takviyelerinin, yetersiz beslenen insanlarda gıdanın yerini tutmaması gerektiği belirtilmektedir (Maughan *vd.*, 2004). Bazı gıda takviyeleri ve bitkisel tedavilerin yan etkileri Tablo 2’ de belirtilmektedir.

Cologne laboratuvarlarında yürütülen bir çalışmada; 13 farklı ülkeden toplamda alınan 634 farklı gıda takviyesi, steroid hormonu ve onun prekürsörlerini içerip içermediği bakımından incelenmiştir. Sonuç olarak, 94 adet gıda takviyesinin yasaklanmış olan maddeleri içerdiği tespit edilmiş, toplam gıda takviyesinin % 10’unun analiz sonuçlarının ise inandırıcı bulunmadığı; yani steroid içerebileceği aktarılmaktadır (Maughan *vd.*, 2004).

Son yıllarda obezitenin artması ile zayıflamaya yardımcı olan birçok gıda takviyesinin kullanımının arttığı aktarılmaktadır. Zayıflamaya yardımcı olan bu takviyelere yasal olmayan sibutramin, efedrin ve türevlerinin ilavesi ile kısa sürede etki göstermesi, tüketim miktarını artırmaktadır (Kim *vd.*, 2014). Zayıflamak için kullanılan *Garcinia cambogia*, *Ephedra sinica*, kitosan, glukomannan, guar gam gibi takviyelerin kullanıcılar üzerinde hem zayıflama hem de yan etkilerinin incelendiği belirtilmektedir. Bunlar arasında sadece efedrin içeren takviyelerin zayıflamada etkili; ancak yan etki riskinin yüksek olduğu aktarılmaktadır (Pittler & Ernst, 2004).

Gıda takviyeleri ve hipertansiyon ile ilişkisi üzerine yapılan bir derlemede, gıda takviyesi kullanan bireylerde tansiyonlarının düzenlenebileceği ve ilaç kullanmaya gerek olmadığı algısının yaygın olduğu aktarılmaktadır. Hipertansiyon için kullanılan gıda takviyelerinin (koenzim Q10, balık yağı, sarımsak, C vitamini) tansiyon düzenlemede ve iyileştirmede faydalı olabileceği bildirilmekte; ancak bazı takviyelerin (efedra, ginseng, acı portakal, meyan kökü) kan basıncını artırıcı etkilerinden dolayı dikkat edilmesi gerektiği belirtilmektedir (Rasmussen *vd.*, 2012).

Soare ve diğerleri (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, 6 ay boyunca 56 kişinin kullandığı farklı gıda takviyelerinin

sağlık üzerine olumlu etkisinin olmadığı aktarılmaktadır. Çalışma süresince kişilere her gün 10 farklı gıda takviyesi (resveratrol, yeşil, siyah ve beyaz çay ekstraktı, nar ekstraktı, kuersetin, karnitin, lipoik asit, kurkumin, sesamin, tarçın ekstraktı ve balık yağı) verilmiştir. Bu süreçte kişilerde damar sertliği, iltihap ve oksidatif stres ile kardiyometabolik risk ölçümlerinin takip edildiği bildirilmiştir. Altı ayın sonunda belirtilen fonksiyonlarda ve vücut yağ oranı, kan basıncı, glikoz, insülin gibi değerlerde değişim olmadığı saptanmıştır.

Balık yağı gıda takviyelerinde civa (Hg), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve arsenik (As) gibi ağır metal bulaşanlarının belirlenmesine yönelik bir çalışmada, 15 adet kapsül formda ve 18 adet sıvı formda balık yağı analiz edildiği belirtilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği’nde gıda takviyelerinde Hg, Cd ve Pb elementlerine ait maksimum limitler bulunmaktadır. Bu limitlere göre incelendiğinde tüm balık yağ numunelerin Hg, Cd ve Pb değerlerinin Türk Gıda Kodeksi’nde belirtilen limitlere uygun olduğu aktarılmaktadır. Ancak Türk Gıda Kodeksi’nde arsenik elementine ilişkin yasal bir limit bulunmadığından değerlendirme yapılamadığı bildirilmektedir. Balık yağları ve diğer bitkisel/hayvansal gıda takviyelerinin kullanımındaki artış düşünüldüğünde bu ürünlerde diğer bulaşanlar ve doz değerleri açısından uzun süreli kullanımlarına yönelik ileri düzeyde çalışmaların yapılmasının gerektiği belirtilmektedir (Güzelsoy & İzgi, 2015).

Bazı Gıda Takviyelerinin Günlük Kullanım Limitleri

Diyetin önemi sağlıklı bir yaşam için gün geçtikçe artmaktadır. Vitamin ve mineraller gibi besin bileşenlerinin tüketimi oldukça önemlidir. Bu gibi besin bileşenlerinin gıda takviyeleri yolu ile fazla alınımın yan etkilere sebep olduğu bildirilmektedir (Anonim, 2006).

Ülkemizde 2013 yılında yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği’nde (Tebliğ No: 2013/49) kullanılabilen vitamin, mineraller ve onların formları belirtilmiştir. Yönetmelikte takviye edici gıdalarda kullanılan vitamin ve minerallerin de günlük maksimum limitleri Tablo 3’ de verilmektedir (Anonim, 2013).

Tablo 1. Bazı vitamin ve minerallerin ilaçlarla olan interaksyonu (Yetley, 2007)**Table 1.** Interactions of some vitamins and minerals with drugs (Yetley, 2007)

Gıda Takviyesi	İlaç	İnteraksiyon
A vitamini	Absiksimab, asenokumarol, dermatan sülfat, dikumarol, heparin, varfarin vs. Asitresin, karob, etretinat vs. Kolestipol	Kanamayı artırma riski A vitamini toksisitesini artırma A vitamini etkisini azaltma
Niasin	Nikotin	Kızarma ve baş dönmesi
B 12 Vitamini	Askorbik asit	Vücutta ve serumda siyanokobalaminin faydasını azaltma Siyanokobalamin emilimini azaltma Antikoagülan etkinliğini azaltma
K vitamini	Aminosalisilik asit, simetidin vs. Varfarin	İlaç etkinliğini azaltma
Kalsiyum	Aspirin, bizmut sabsitrat, proksetil, doksisiklin, metasiklin, demir vs.	
Magnezyum	Kalsitriol, dokserkalsiferol Amikasin, dibekasin, streptomisin, tobramisin vs. Dikumarol	Hipermagnezemi Nöromusküler zayıflık
Demir	Felodipin, isradipin Asetohidroksamik asit, sefdinir, sinoksasin, doksisiklin, ofloksin, minosiklin, tetrasiklin, penisilamin vs. Asetohidroksamik asit, kalsiyum, alüminyum fosfat, kolestiramin, sodyum karbonat, doksisiklin, bikarbonat vs. Levotroksin	Kanamayı artırma riski Tansiyon düşmesi İlaç etkinliğini azaltma Demir etkinliğini azaltma Tiroit yetmezliği

Tablo 2. Bazı gıda takviyeleri ve bitkisel tedavilerin yan etkileri**Table 2.** Side effects of some dietary supplements and herbal treatments

Ürün/ Bileşen/ Tablet	Yan etki	Kaynak
Gokshuradi guggul, Sinhanad guggul, Chandraprabha vati (Tablet)	Diyare ve bulantı	Pittler & Ernst, 2004
Kitosan <i>Garcinia cambogia</i> Hidroksisitrik asit	Kabızlık, diyare, şişkinlik, baş ağrısı Baş ağrısı, gastrointestinal rahatsızlıklar Karın ağrısı	Pittler & Ernst, 2004 Heymsfield <i>vd.</i> , 1998 Pittler & Ernst, 2004
Yohimbine Efedrin <i>Ephedra sinica</i> (zayıflamak için) (Efedrin otu)	Uyku bozukluğu, sinirlilik, baş ağrısı Psikiyatrik belirtiler Sıcaklık çarpması	Pittler & Ernst, 2004 Pittler & Ernst, 2004 Pittler <i>vd.</i> , 2005
<i>Ephedra sinica</i> (vücut geliştirmek için)	Nefes darlığı, göğüs ağrısı	Pittler <i>vd.</i> , 2005
Guarana (<i>Paullinia cupana</i>)	Uyuşma/karincalanma, diyare, bulantı, çarpıntı	Pittler <i>vd.</i> , 2005
Karniyarik otu (<i>Plantago psyllium</i>)	Yorgunluk, iştahsızlık, sarılık	Fraquelli <i>vd.</i> , 2000
Guar gam	Baş ağrısı, bulantı, flatülans	Blake <i>vd.</i> , 1997
Kalsiyum takviyesi	Kardiovasküler hastalıklar	Reid <i>vd.</i> , 2011

Tablo 3. Takviye Edici Gıdalarda Kullanılan Bazı Vitamin ve Minerallerin Günlük Maksimum Limitleri**Table 3.** Daily maximum limits of some vitamin and minerals used in dietary supplements

Vitamin ve Mineraller	4-10 yaş**	11 yaş ve üzeri
Vitamin A (RE) (µg)	500	1000
Beta-karoten (mg)	3.5	7
Vitamin D (µg)	12.5	25
Vitamin B1 (tiamin) (mg)*	-	-
Vitamin B2 (riboflavin) (mg)*	-	-
Vitamin B3 (niasin) (mg NE)***	250	500
Vitamin B6 (piridoksin) (mg)	5	10
Vitamin C (mg)	500	1000
Folik asit (µg)	300	600
Biotin (µg)*	-	-
Selenyum (µg)	100	200
İyot (µg)	75	150
Çinko (mg)	7.5	15
Kalsiyum (mg)	750	1500
Demir (mg)	8.5	17
Fosfor (mg)	350	700
Potasyum (mg)	750	1500
Flor (mg)	1.75	3.5
Sodyum (mg)*	-	-

*Limit belirlenmemiştir.

**11 yaş ve üzeri için verilen limitlerin %50'si kabul edilmiştir.

***Nikotinik asit içeren takviye edici gıdalar ayrıca değerlendirilir.

Sonuç

Gıda takviyelerinin ilaç olarak değerlendirilmemesi gerektiği ancak doğru kişi tarafından önerildiğinde ve doğru şekilde tüketildiğinde bireyin sağlığını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. Gıdaların ve bileşenlerinin fonksiyonel özellikleri gıda takviyelerinin kullanımını teşvik etmiş ve günümüzde sağlığın korunması açısından gerekli hale gelmiştir. Günümüzde yanlış ve yetersiz beslenme ya da tüketilen üründen gereken faydanın sağlanamaması gibi problemler gıdaların doğru ve dozunda tüketilmemesinden kaynaklanmaktadır. Bireylerin sağlıklı olabilmesi için gerekli bileşenler (vitamin, mineral vb.) farklı sebeplerden dolayı artık gıdalardan sağlanamamakta ve bunun sonucunda takviye edici gıdalara eğilim artmaktadır. Günümüzde, gıdaların fonksiyonel özellikleri (antioksidan, besinsel lif, aminoasit vb.) gıda takviyeleri sektöründe yeni ürünlerin gelişimine olanak sağlamakta ve bu takviyelere ihtiyaç duyan bireylerin gereksinimleri karşılanabilmektedir. Gıda takviyeleri faydalı ve destekleyici etkilerinin yanında birçok farklı soruna da neden olabilmektedir.

Vitamin ve mineral kaynakları gibi gıda takviyeleri doğal veya sentetik olarak üretilmektedir. Bunların seçiminde

en önemli husus güvenilirlik ve biyoyararlılıkları olmalıdır. Gıda takviyeleri tüketilmeden veya satın alınmadan önce FAO ve WHO standartlarının, bu kurumların kriterlerinin bulunmadığı durumlarda ise ulusal tüzüklerin dikkate alınması gerekmektedir. Türkiye’de ise Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı onayı ile ürünlerin satışına izin verilmektedir (Tek & Pekcan, 2008; Ergen & Bozkurt Bekoğlu, 2016).

Günümüzde artan “sağlıklı olma” anlayışı gıda takviyeleri gibi alternatif yollara olan ilgiyi artırmaktadır. Ancak; gıda takviyelerinin ilaçlar ile olumsuz interaksyonlarında da artış görülmektedir. Bu olumsuz interaksyonların kayıtlara geçmemesi tüm gıda takviyelerinin zararsız olduğu yönünde bir yanılgı yaratmamalıdır. Bu nedenle; gıda takviyelerinin tüketimi kanuni düzenlemelere bağlanmalı ve bu düzenlemelere göre halkın eğitilmesi yönünde adımlar atılmalıdır (Özcan, 2011). Çünkü “*takviye edici*” gıda altında ruhsat alıp, bitkisel tedavi edici şekliyle piyasaya sürülen birçok ürün bulunmaktadır. Hiçbir standardizasyona sahip olmayan bu ürünler bireye özgü değerlendirilmeden, denetim yapılmadan ve televizyon, radyo, internet üzerinden tanıtılıp satılmaktadır. Bu durum, hem sağlık hem de ekonomik açıdan zararlara sebep olmaktadır (Özcan, 2011; Türkmen vd.,

2014; Ergen & Bozkurt Bekoğlu, 2016). Amerika’da bir yılda yaklaşık 20.000 vakanın gıda takviyelerini yanlış ve/veya bilgisizce kullanımı sonucunda kardiovasküler rahatsızlık belirtileri ile hastanelere başvurduğu belirtilmektedir (Geller *vd.*, 2015).

Gıda Takviyeleri ile ilgili belirlenen sorunlar arasında kontaminasyon, katkı maddeleri, toksisite ve yanlış doz ve etiketlemeden kaynaklı problemler sayılmaktadır. Özellikle son zamanlarda ülkemizde ve dünyada söz konusu ürünlere ilişkin zehirlenmeler ve ilaç interaksyonlarının neden olduğu durumlar mevcuttur. Bu durumlar, alternatif ya da destekleyici ürün adı altında piyasaya sunulan ürünlerin üretimi, ruhsatlandırılması, satışı ve denetimi konusunda ciddi düzenlemelere ve uygulamalara ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Türkmen *vd.*, 2014; Ergen & Bozkurt Bekoğlu, 2016).

Gıda takviyelerinin sağlıklı bir şekilde kullanılmasına yönelik öneriler aşağıda verilmektedir;

1. Öncelikli olarak hangi ürünlerin gıda takviyesi, hangi ürünlerin sağlığa ilişkin ürün oldukları belirlenmeli ve etiketlemelere dikkat edilmelidir
2. Bitki ekstraktları veya bunlardan hazırlanan ürünler standardize edilmelidir
3. Bitkisel gıda takviyelerinin doğal ve zararsız olduğu, bu nedenle yan etkisinin olmadığı düşünülmemelidir.
4. Gıda takviyeleri için verilen belgeler dışında ürünlerin etkin takibini kolaylaştıracak yöntemler geliştirilmelidir.
5. Etiketlerde, tüketicinin günlük maksimum miktarı aşmaması yani uygun dozlarda alınması gerektiği belirtilmelidir. Vitamin ve minerallerin aşırı tüketimi toksik etkiye sebep olabilmektedir.
6. Gıda takviyelerinin yemek yerine (günlük öğün) geçmediği ve ürünün küçük çocuklardan uzak tutulması gerektiği belirtilmelidir.
7. Herhangi bir ilaç kullanıyorsanız doktora danışılmadan gıda takviyesi kullanılmamalıdır. İlacın etkisini azaltma ya da yan etki oluşturma gibi olumsuzluklara sebep olabilirler.
8. Diyet yapanlarda takviye kullanımı; diyetle besin alımının yetersiz olması, özel durumlarda gereksinimlerin artması, besin ögesi alımının minimum düzeylerin altında olması gibi durumlarda önerilmelidir.

9. Etiketleme, sunum ve reklam konularında yaptırımlar cezai hükümler şeklinde açık bir şekilde tanımlanmalıdır (Tek & Pekcan, 2008; Özcan, 2011).

Kaynaklar

- Agrawal, R. (2005). Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*, 19, 227-246.
- Al-Sheraji, S.H., Ismail, A., Manap, M.Y., Mustafa, S., Yusof, R.M. & Hassan, F.A. (2011). Functional properties and characterization of dietary fiber from mangifera pajang kort. fruit pulp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3980-3985.
- Anonim (2013). Türk Gıda Kodeksi Takviye Edici Gıdalar Tebliği. Ağustos 2013 (Tebliğ No: 2013/49), Resmi Gazete Tarihi: 16.08.2013, Sayısı: 28737.
- Anonim, (2006). http://ec.europa.eu/food/safety/docs/labeling_nutrition-vitamins_minerals-discus_paper_annot_vitamins_en.pdf (Erişim Tarihi: 06.01.2016.)
- Bailey, R.L., Gahche, J.J., Miller, P.E., Thomas, P.R., Dwyer, J.T. (2013). Why US adults use dietary supplements. *JAMA Internal Medicine*, 173(5), 355-361.
- Blake, D., Hamblett, C.J., Frost, P.C., Judd, P.A., Ellis, P.R. (1997). Wheat bread supplemented with depolymerized guar gum reduces the plasma cholesterol concentration in hypercholesterolemic human subjects¹⁻³. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 107-113.
- Bodhmag, A. (2006). Correlation between physical properties and flowability indicators for fine powders. A Master Thesis, College of Graduate Studies and Research, Department of Chemical Engineering, University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan. 122p.
- Boever, P.D., Wouters, R., Verstraete, W. (2001). Combined use of Lactobacillus reuteri and soygerm powder as food supplement. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 420-424.
- Calder, P.C. (2015). Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 39, 18-32.
- Chambers, S.J., Lambert, N., Plumb, G.W., Williamson, G. (1995). Evaluation of the antioxidant properties of a methanolic extract from ‘Juice Plus fruit’ and ‘Juice

- Plus vegetable' (dietary supplements). *Food Chemistry*, 57 (2), 271-274.
- Chandra, A., Rana, J., Li, Y. (2001). Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3515-3521.
- Coppens, P., Delmulle, L., Gulati, O., Richardson, D., Ruthsatz, M., Sievers, H., Sidani, S. (2006). Use of botanicals in food supplements. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 50, 538-554.
- Davidson, M.H., Dugan, L.D., Stocki, J., Dicklin, M.R., Maki, K.C., Coletta, F., Cotter, R., Mcleod, M., Hoersten, K. (1998). A low-viscosity soluble-fiber fruit juice supplement fails to lower cholesterol in hypercholesterolemic men and women. *The Journal of Nutrition*, 128, 1927-1932.
- Dickinson, A., Blatman, J., El-Dash, N., Franco, J.C. (2014). Consumer usage and reasons for using dietary supplements: report of a series of surveys. *Journal of the American College of Nutrition*, 33(2), 176-182.
- Diop, L., Guillou, S., Durand, H. (2008). Probiotic food supplement reduces stress-induced gastrointestinal symptoms in volunteers: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Nutrition Research*, 28, 1-5.
- Durante, K.M., Whitmore, B., Jones, C.A., Campbell, N.R. (2001). Use of vitamins, minerals and herbs: a survey of patients attending family practice clinics. *Clinical and Investigative Medicine*, 24, 242-249.
- Eccleston, C., Baoru, Y., Tahvonon, R., Kallio, H., Rimbach, G.H., Minihane, A.M. (2002). Effects of an antioxidant-rich juice (sea buckthorn) on risk factors for coronary heart disease in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 346-354.
- Ergen, A., Bozkurt Bekoğlu, F. (2016). Türkiye'de besin destek ürünlerine yönelik görüşler ve tüketici profilini tanımlamaya yönelik bir araştırma. *Journal of Business Research Turk*, 8(1), 323-341.
- Ersöz, T. (2012). Bitkisel ilaçlar ve gıda takviyeleri ile ilgili genel yaklaşım ve sorunlar. *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi Türk Eczacıları Birliği Yayını*, 27-28, 11-21.
- Escrig, A.J., Rincon, M., Pulido, R., Calixto, F.S. (2001). Guava fruit (psidium guajava l.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5489-5493.
- Femenia, A., Robertson, J.A., Waldron, K.W., Selvendran, R.R. (1998). Cauliflower (*Brassica oleracea* L), globe artichoke (*Cynara scolymus*) and chicory witloof (*Cichorium intybus*) processing by-products as sources of dietary fibre. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 511-518.
- Fraquelli, M., Colli, A., Cocciolo, M., Conte, D. (2000). Adult syncytial giant cell chronic hepatitis due to herbal remedy. *Journal of Hepatology*, 33, 505-508.
- Geil, P., McWhorter, L.S. (2008). Dietary supplements in the management of diabetes: potential risks and benefits. *The Journal of the American Dietetic Association*, 108, 59- 65.
- Geller, A.I., Shehab, N., Weidle, N.J., Lovegrove, M.C., Wolpert, B.J., Timbo, B.B., Mozersky, R.P., Budnitz, D.S. (2015). Emergency department visits for adverse events related to dietary supplements. *The New England Journal of Medicine*, 373(16), 1531-1540.
- Güzelsoy, N.A., İzgi, B. (2015). Balık Yağı Gıda Takviyelerinde Metal Bulaşanlarının (As, Hg, Cd, Pb) Belirlenmesinde Analitik Parametrelerinin Optimizasyonu. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 15, 19-26.
- Halsted, C.H. (2003). Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 1001-1007.
- Harding, K.L., Judah, R.D., Gant, C.E. (2003). Outcome-based comparison of Ritalin® versus food-supplement treated children with AD/HD. *Alternative Medicine Review*, 8(3), 319-330.
- Harnack, L.J., Rydell, S.A., Stang, J. (2001). Prevalence of use of herbal products by adults in the Minneapolis/St Paul, Minn, Metropolitan Area. *Mayo Clinic Proceedings*, 76, 688-694.
- Heymsfield, S.B., Allison, D.B., Vasselli, J.R., Pietrobelli, A., Greenfield, D., Nunez, C. (1998). *Garcinia cambogia* (hydroxycitric acid) as a potential antiobesity agent a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, 280(18), 1596-1600.

- Kalt, W., Dufour, D. (1997). Health functionality of blueberries. *Hort Technology*, 7(3), 216-221.
- Kim, H.J., Lee, J.H., Park, H.J., Cho, S.H., Cho, S., Kim, W.S. (2014). Monitoring of 29 weight loss compounds in foods and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 31(5), 777-783.
- Kolb, N., Vallorani, L., Milanovic, N., Stocchi, V. (2004). Evaluation of Marine Algae Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Kombu (*Laminaria digitata japonica*) as food supplements. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 57-61.
- Lange, D. (1998). European medicinal and aromatic plants: Their use, trade and conservation. Traffic International, Cambridge, United Kingdom: s.119.
- Leonard, S.S., Cutler, D., Ding, M., Vallyathan, V., Castranova, V., Shi, X. (2002). Antioxidant properties of fruit and vegetable juices: more to the story than ascorbic acid. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 32(2), 193-200.
- Lewis, D.A., Fields, W.N., Shaw, G.P. (1999). A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, 283-288.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.
- Maughan, R.J., King, D.S., Lea, T. (2004). Dietary supplements. *Journal of Sports Science*, 22, 95-113.
- McWhorter, L.S. (2009). Dietary supplements for diabetes: an evaluation of commonly used products. *Diabetes Spectrum*, 22(4), 206-213.
- Mol, S. (2008). Balık yağı tüketimi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Journal of Fisheries Sciences.com*, 2(4), 601-607.
- Özcan, V. (2011). Bitkisel gıda takviyeleri alanına ilişkin bir durum değerlendirmesi: sorunlar ve çözüm önerileri. *Türkiye Eczacılar Birliği Haberler*, Temmuz-Ağustos, 16-22.
- Pasiakos, S.M., McLellan, T.M., Lieberman, H.R. (2015). The effects of protein supplements on muscle mass, strength, and aerobic and anaerobic power in healthy adults: a systematic review. *Sports Medicine*, 45, 111-131.
- Petroczi, A., Taylor, G., Naughton, D.P. (2011). Mission Impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 393-402.
- Pittler, M.H., Ernst, E. (2004). Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review^{1,2}. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 529-536.
- Pittler, M.H., Schmidt, K., Ernst, E. (2005). Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. *Obesity Reviews*, 6, 93-111.
- Playford, R.J., Floyd, D.N., MacDonald, C.E., Calnan, D.P., Adenekan, R.O., Johnson, W., Goodlad, R.A., Marchbank, T. (1999). Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. *Gut*, 44, 653-658.
- Playford, R.J., MacDonald, C.E., Calnan, D.P., Floyd, D.N., Podas, T., Johnson, W., Wicks, A.C., Bashir, O., Marchbank, T. (2001). Co-administration of the health food supplement, bovine colostrum, reduces the acute non-steroidal anti-inflammatory drug-induced increase in intestinal permeability. *Clinical Science*, 100, 627-633.
- Rasmussen, C.B., Glisson, J.K. & Minor, D.S. (2012). Dietary supplements and hypertension: Potential benefits and precautions. *The Journal of Clinical Hypertension*, 14(7), 467-471.
- Rautiainen, S., Manson, J.E., Lichtenstein, A.H., Sesso, H.D. (2016). Dietary supplements and disease prevention — a global overview. *Nature Reviews*, 12, 407-420.

- Reid, I.R., Bolland, M.J., Avenell, A., Grey, A. (2011). Cardiovascular effects of calcium supplementation. *Osteoporosis International*, 22, 1649-1658.
- Rodriguez, R., Jimenez, A., Bolanos, J.F., Guillen, R., Heredia, A. (2006). Dietary fiber from vegetable products as source of functional ingredients. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 3-15.
- Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds —recent developments. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 401-413.
- Soare, A., Weiss, E.P., Holloszy, J.O., Fontana, L. (2014). Multiple dietary supplements do not affect metabolic and cardiovascular health. *Aging*, 6(2), 149-157.
- Soni, M.G., Burdock, G.A., Christian, M.A., Bitler, C.M., Crea, R. (2006). Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 903-915.
- Souza, E.M.T., Sousa, L.M., Arruda, S.F., Siqueira, E.M.A. (2002). Protein improves the bioavailability of calcium and phosphorus from an alternative dietary supplement in rats. *Nutrition Research*, 22, 945-955.
- Sullivan, P.G., Geiger, J.D., Mattson, M.P., Scheff, S.W. (2000). Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Annals of Neurology*, 48 (5), 723-729.
- Tek, N.A., Pekcan, G. (2008). Besin destekleri kullanılmalı mı? *Klasmat Matbaacılık*, 32s, ISBN: 978-975-590-243-2
- Tousel, M.D. (2015). The manufacturing process, tablet and capsule manufacturing. *Techceuticals*, 15, 1-12.
- Türkmen, Z., Türkdöğru, S., Mercan, S., Açikkol, M. (2014). Bitkisel ürünlerin ve gıda destek ürünlerinin içeriklerinin adli ve hukuki boyutu. *Adli Tıp Bülteni*, 19(1), 38-48.
- Wolfe, K.L., Liu, R.H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8896-8907.
- Yetley, E.A. (2007). Multivitamin and multimineral dietary supplements: definitions, characterization, bioavailability, and drug interactions¹⁻³. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 269-276.

STUDY OF INCREASING THE PRODUCTION OF VOLATILE FLAVOR COMPOUNDS BY THE YEAST *Kluyveromyces marxianus* THROUGH OPTIMIZATION OF CARBON AND NITROGEN SOURCES

Müge İşleten Hoşoğlu 

Cite this article as:

İşleten Hoşoğlu, M. (2018). Study of Increasing the Production of Volatile Flavor Compounds by the Yeast *Kluyveromyces marxianus* Through Optimization of Carbon and Nitrogen Sources. Food and Health, 4(2), 112-123. DOI: 10.3153/FH18011

Canakkale Onsekiz Mart University,
Food Engineering Department,
Terzioğlu Campus, Canakkale, Turkey

ABSTRACT

The regulation of growth and the production of flavor compounds by *Kluyveromyces marxianus* were accomplished according to the nutritional requirements (yeast extract, ammonium sulphate and glucose concentrations) by using Response Surface Methodology experiments. Results proved that increasing both initial yeast extract (YE) and glucose concentrations in the fermentation medium favored both the growth and production of fusel alcohols. The major fusel alcohol (isoamyl alcohol) and the acetate ester compound (ethyl acetate) produced in all flasks were determined in the concentration range 1299-3996 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 1558 to 3122 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. In a scale-up attempt, productions were accomplished in a 5 L stirred tank bioreactor. The highest productivity values for major volatile flavor compounds, i.e., ethyl acetate (fruity), isoamyl alcohol (banana), 2-phenylethyl acetate (floral) were obtained during the exponential growth of the yeast in a 5 L stirred tank bioreactor. Additionally, the descriptive sensory terms “sourdough”, “flower” and “sweet aromatic” were characteristics for volatile compounds produced by *K. marxianus*. This work also demonstrated high product losses due to the stripping effect when the production scaled up from flasks to bioreactor.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus*, Natural flavor compounds, Optimization, Bioreactor, Sensory evaluation

Submitted: 30.05.2017

Accepted: 11.11.2017

Published online: 22.01.2018

Correspondence:

Müge İŞLETEN HOŞOĞLU

E-mail: muge.isleten@gmail.com

©Copyright 2018 by ScientificWebJournals

Available online at

www.scientificwebjournals.com

Introduction

Due to an increasing preference of the consumers for natural food additives and other compounds of biological origin, there has been increasing trend towards the production of flavor compounds by biotechnological process (Janssens *et al.* 1992; Medeiros *et al.* 2000; Mantzouridou *et al.* 2013; Berger, 2015). Although several bacteria, yeasts and fungi have been reported for the production of flavor compounds, a few species of yeasts and fungi have generally been preferred, and only a few of these find industrial application due to their GRAS (generally recognized as safe) status. Among the different producers, food grade yeast *Kluyveromyces marxianus* has been pointed out as a promising organism for the production of natural flavor compounds such as fruit esters, carboxylic acids, ketones, furans, alcohols, monoterpene alcohols, and isoamyl acetate in liquid fermentation (Medeiros *et al.* 2000; Gethins *et al.* 2015; Morrissey *et al.* 2015). Because of its ability to grow on a broad variety of substrates, at higher temperatures and rapid growth, many efforts have been made with this yeast like production of enzymes (Panesar, 2008), single cell protein (Aggelopoulos *et al.* 2014), reduction of lactose content in food products (Manera *et al.*, 2008). With regard to the production of flavor compounds using *K. marxianus*, most progress has been made specifically with the production of 2-phenylethanol (2-PE) (Etschmann *et al.* 2003; Etschmann *et al.* 2004), ethyl acetate (Urit *et al.* 2003a; Urit *et al.* 2003b) and the production of total volatile compounds by using inexpensive waste-stream medium as the growth medium (Medeiros *et al.* 2000; Wilkowska *et al.*, 2014; Guneser *et al.* 2015). However, industrial production of sufficient quantities of yeast as starter cultures implies characterization of yeast physiology and nutritional requirements. Therefore, it is important to assess what kind of flavor compounds are synthesized by *K. marxianus* when growing on defined and/or semidefined culture medium rather than growing on waste stream (Gethins *et al.* 2015). Medium composition especially carbon and nitrogen sources, is one of the critical factor for both growth and production flavor compounds by yeasts (Fabre *et al.* 1998; Gethins *et al.* 2015; Löser *et al.* 2015). Hence, to obtain high biomass and metabolite productivities, it is important to find appropriate types of nutrients and their optimum concentrations in growth medium of the yeast (Manera *et al.* 2008; Fonseca *et al.* 2013; Yilmaztekin *et al.* 2013). Additionally, reducing the cost of culture medium by optimizing its composition is the basic research for industrial applications (Etschmann *et al.* 2004; Manera *et al.* 2008). Etschmann *et al.* (2004) optimized the growth medium of *K. marxianus* CBS 600 for production of 2-PE. In a recent study, it was also revealed that nitrogen and carbon

source had pronounced effects on production of volatile metabolites by four strains of *K. marxianus* (Gethins *et al.* 2015). It was concluded that, nitrogen source and carbon source had pronounced effects on production of volatile metabolites. However, there was no information about the specific nutritional requirements and their optimum concentrations in the medium for maximizing the growth and production of each volatile flavor compounds by *K. marxianus*.

Response surface methodology (RSM) is a collection of mathematical and statistical techniques useful for designing experiments, establishing models, and analyzing the effects of several independent factors. The main advantage of RSM is the reduced number of experimental trials needed to evaluate multiple factors. Also, study of the individual and interactive effects of these factors will be helpful in efforts to find the target value. Hence, RSM provides an effective tool for investigating the aspects affecting desired response if there are many factors and interactions in the experiment (Garrido-Vidal *et al.* 2003; Elibol, 2004). The aims of this study were two-fold: first, on the basis of optimization of the growth medium, the present author intended to better understand the effect of carbon (glucose) and different nitrogen substances (yeast extract and ammonium sulphate) and to find their optimum medium composition for increasing the growth and the production volatile flavor compounds by *Kluyveromyces marxianus* NRRL YB-6373; the second aim was to determine the changes in the production of flavor compounds during the yeast growth in 5 L bioreactor in the optimized culture medium.

Materials and Methods

Microorganism and Inoculum Preparation

The *Kluyveromyces marxianus* NRRL YB-6373 was obtained from ARS Culture Collection (NRRL collection, Peoria, Illinois, USA). The inoculant culture was grown in a medium containing 10 g of glucose, 6 g of yeast extract and basal salts comprising 1 g of KH_2PO_4 , 1 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ per liter of deionized water. For flask cultivations belonging to experimental design, fermentations were carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL fermentation medium. Erlenmeyer flasks were closed with caps. After sterilization, each flask was inoculated at a concentration of 10^6 cfu mL^{-1} into 100 mL medium and incubated at 120 rpm in an orbital shaker at 30 °C. Fermentation was ceased after 24 h (Guneser *et al.* 2015).

Determination of Cell Dry Weights (g/L)

Cell dry weights (g L^{-1}) were obtained by separating the yeasts from a defined volume of suspension via centrifugation (at 7000 rpm for 10 min), washing the pellet twice with

distilled water, drying at 103 °C until constant weight and cooled to room temperature in a desiccator before weighing (Löser *et al.* 2015).

Extraction, Identification and Quantification of F&F Compounds

Volatile compounds in fermented liquid were extracted by solid-phase microextraction (SPME) for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis (Pawliszyn, 2012; Gethins *et al.* 2015; Guneser *et al.* 2015). Two mLs of the sample was added in 40 mL amber colored screw top vial with hole cap PTFE/silicon septa (Supelco, Bellafonte, USA), and 1 g of NaCl was added to the vial. The vial was kept at 40 °C in a water bath for 15 min to equilibrate the volatiles in headspace. Then, SPME (2 cm to 50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS, Supelco, Bellafonte) needle was inserted into the vial and was exposed in the headspace for 15 min at 40 °C in a water bath. The sample was then immediately injected into GC-MS for identification and quantification of volatile compounds.

Volatile compounds were identified by GC-MS. Nonpolar HP5 MS column (30-m 9 0.25-mm i.d. 9 0.25-µm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA) was used for separation of flavour compounds. GC-MS system consisted of an HP 6890 GC and 7895C mass selective detector (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA). GC oven temperature was programmed from 40 to 230°C at a rate of 10°C min⁻¹ with initial and final hold times of 3 and 15 min, respectively. Helium was used as a carrier gas at a flow of 1.5 mL min⁻¹. The MSD conditions were as follows: capillary direct interface temperature, 280°C; ionization energy, 70 eV; mass range 35–350 amu; scan rate, 4.45 scans/s. Flavor compounds were identified based on comparison of the mass spectra of unknown compounds with those in the National Institute of Standards and Technology (NIST), Wiley Registry of Mass Spectral Data. Compound identification was performed on chromatograms containing a peak at identical retention times with greater than 85% similarity to NIST and Wiley mass spectrums. Flavor compounds were quantified based on relative abundances of the compounds by Eq. 1 (Guneser *et al.* 2015). 2-methyl-3-heptanone was used as internal standard (IS) for neutral-basic compounds at a concentration of 0.82 µg.

Mean relative abundance (µg L⁻¹) = concentration of IS x peak area of compound/peak area of the IS

$$(Eq. 1)$$

Residual Sugar

The substrate glucose was recognized and quantified by UHPLC (Thermo, USA) with a Phenomenex Rezex RHM Monosaccharide (H+) 300 mm × 7.8 mm ion exchange column, using a Shodex Refractive Index Detector. The column and detector temperatures were 65 °C and 45 °C, respectively, and the injection volume was 15 µL. A solution of H₂SO₄ (5 mM) was used as the mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min (Isleten-Hosoglu *et al.* 2012).

Batch Cultivation in Stirred Tank Bioreactor

Batch cultivation was also performed in a 5 L stirred tank bioreactor (STR) (Biostat A-plus, Sartorius, Melsungen, Germany) with 4 L working volume. The STR was equipped with two six blade disk impellers (diameter 53 mm). A dissolved oxygen probe (Hamilton Oxyferm FDA 225, Bonaduz, Switzerland) and a pH sensor (Hamilton Easyferm K8 200, Bonaduz, Switzerland) were installed on the top plate of the bioreactor. The initial pH was 5.6 and was not controlled throughout the experiments. Aeration rate and temperature were set as 0.5 vvm, 30 ± 1°C, respectively with 120 rpm agitation rate. There was no intervention on process parameters during the production.

The exponential growth phase (EGP) was determined as the linear region on an ln (X) versus time plot, where X is the cell concentration in terms of cell dry weight (g L⁻¹). The maximum specific growth rate (µ_{max}) was determined as the slope of this linear region. The biomass yield on substrate (Y_{x/s}) was determined as the slope of the line on an X versus S plot, exclusively including points belonging to the EGP, where S is the substrate (glucose) concentration (Doran, 1999).

Sensorial Analysis

A roundtable discussion was conducted as defined in Guneser *et al.* (2015) to determine descriptive sensory properties and changes in aroma profiles of during the production in a bioreactor (at 9 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) versus control samples. Seven trained panelists were involved in sensory evaluation with no restriction on descriptive terms. Samples (10 mL) were put in small containers with cap and containers were kept in water bath at 40 °C for 15 min for ensuring the accumulation of volatiles in the headspace. Panelist's quantified the attributes using 15-point product-specific scale anchored to the left with 'not' and on the right with 'very' (Meilgaard *et al.* 1999).

Experimental Design and Data Analysis

Response surface methodology (RSM) designs such as Box-Behnken and Central Composite Design (CCD) model

probable curvature of the response function (Mandenius *et al.* 2008). Central composite design (CCD), a method of response surface design in Design Expert software (version 7.0.0, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN), was used to perform the experimental design for the optimization of carbon (glucose), nitrogen concentrations (yeast extract and ammonium sulphate) in the medium. A total of 20 runs were used to optimize the range and levels of the chosen variables. This cubic design is characterized by a set of points located at the midpoint of each edge of a multi dimensional cube and center point replicates ($n = 6$) whereas the 'missing corners' help the experimenter to avoid the combined factor extremes. This property prevents a potential loss of data in those cases (Box & Behnken, 1960). For predicting the optimum point, a second order polynomial function is fitted to correlate relationship between independent variables and response. For three factors, the corresponding equation is:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

$$Y = 2.39 + 0.46 * X_1 - 0.22 * X_2 + 0.84 * X_3 + 0.044 * X_1 * X_2 + 0.13 * X_1 * X_3 + 0.031 * X_2 * X_3 - 0.14 * X_1^2 + 0.21 * X_2^2 - 0.15 * X_3^2$$

Where Y represents the response variable, β_0 is model constant, β_1 , β_2 and β_3 are linear coefficients, β_{12} , β_{13} and β_{23} are interaction effect coefficients, β_{11} , β_{22} and β_{33} are quadratic coefficients, and X_1 , X_2 and X_3 are the coded levels of independent variables. The terms $X_i X_j$ and X_i^2 ($i=1,2$ or 3) represent the interaction and quadratic terms, respectively.

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the differences in intensities of flavor compounds obtained by GC-MS analysis during the production in bioreactor. The ANOVA model used in this study is given in the equation $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$, where Y_{ij} is the j^{th} observation value in i^{th} sample; μ is the general population mean; α_i is the effect of i^{th} sample; and ε_{ij} represents random error terms (Winer *et al.* 1991). Nonmetric Multidimensional Scaling (MDS) method was also applied in this study to indicate relationship between intensities of flavor compounds obtained by GC-MS analysis and descriptive sensory analysis (MacKay & O'Mahony, 2002). For all statistical analysis, SPSS (version 18.0; SPSS Institute Inc., Chicago, IL) was used.

Results and Discussion

Optimization of Carbon and Nitrogen Sources in Growth Medium of *K. marxianus* for the Growth

Experiments were carried out in order to study the effect of two different nitrogen sources (yeast extract and ammonium sulphate) and glucose on the growth and the production of

flavor compounds by the yeast *K. marxianus*. Central-composite design for three nutrient sources along with their low, medium and high levels was applied. According to the implemented design, twenty combinations were performed for 24 h. In the experimental design model, yeast extract (6-20 g L⁻¹), ammonium sulphate (6- 20 g L⁻¹) and glucose (12-40 g L⁻¹) were taken as input variables (Table 1). Cell dry weight (g L⁻¹) and the amount of each flavor compounds ($\mu\text{g L}^{-1}$) were taken as responses of the system. All responses in different experimental conditions based on the experimental design matrix were estimated and results of each have also been included in Table 2. Model equations can be obtained for whole responses. For example, a second order polynomial model for the response cell dry weight (g L⁻¹) wherein the interaction terms have been fitted to the experimental data obtained from the CCD experiment can be stated in the form of the following equation:

(Eq.2)

where Y is the predicted response, i.e. the cell dry weight (g L⁻¹), and X_1 , X_2 , and X_3 are the coded values of the test variables, yeast extract, ammonium sulphate and glucose concentrations (g L⁻¹), respectively.

Table 1. Experimental range and levels of the independent variables (yeast extract, ammonium sulphate and glucose) central composite design plan in actual value and observed responses

Variables (g L ⁻¹)	Symbol	Actual levels of coded factors				
	Coded	-1.682	-1	0	1	+1.682
Yeast extract	X ₁	1.23	6	13	20	24.77
Ammonium sulphate	X ₂	1.23	6	13	20	24.77
Glucose	X ₃	2.45	12	26	40	49.55

The statistical analysis of the model was accomplished in the form of analysis of variance (ANOVA). The model F-value of 48.46 indicated that the model was significant for the cell dry weight ($p < 0.01$). According to the ANOVA test, there was not a significant interaction between nutrient sources on cell dry weight of *K. marxianus* ($p < 0.01$). However, the effect of each nutrient source was significant, individually. Increasing the initial yeast extract and glucose concentrations in the growth medium enhanced the growth of yeast. On the other hand, the cell dry weight significantly decreased by increasing concentrations of ammonium sulphate. This may due to the rapid consumption of ammonium which leads to an ionic imbalance and acidification in the

medium. The growth of yeast can be effected by such acidification in the medium (Löser *et al.* 2015). In the present study, availability of both organic and inorganic nitrogen sources in the growth medium showed the preference of yeast for the organic nitrogen source. This may due to the rich amino acid content, vitamins, salts, growth promoting substances of yeast extract than ammonium sulphate which could possibly lead to improved nitrogen utilization for anabolic processes (Tanyol *et al.* 2015). In a similar manner, supplementing the whey medium with yeast extract or yeast extract plus ammonium sulphate increased the biomass concentration of *K. marxianus* in comparison to the control and supplementing with only ammonium (Parrondo *et al.* 2009). A production of yeast biomass and the right balance between yeast growth and synthesis of total volatile flavor compounds are important factors for the economy of the total volatile compounds (Löser *et al.* 2015). This balance can be optimized by using such kind of statistical approaches applied in this study. In the present study, biomass yield for flasks varied from 0.4 up to 3.85 g L⁻¹ for 24 h cultivation (Table 2) which was higher than the previous study performed with other type of yeast strain in medium supplemented with different inorganic nitrogen sources (Löser *et al.* 2015).

Optimization of Carbon and Nitrogen Sources in Growth Medium of K. marxianus for Production of Volatile Flavor Compounds

Under the different experimental conditions tested due to the experimental design matrix (Table 2), seven volatile flavor compounds were detected at levels above control conditions (noninoculated medium). The major compounds were belonging to the esters and alcohols. The volatile flavor compounds were ethanol, ethyl acetate (fruity), isoamyl alcohol (banana), isoamyl acetate (fruity), 2-phenylethyl alcohol (rose), 2-phenylethyl acetate (floral) and 2-phenylethyl propanate (floral) (Table 2). There were significant differences between flasks in respect to flavor compounds. When a general evaluation made, isoamyl alcohol was the major compound produced in all flasks, followed by ethyl acetate and then 2-phenylethyl acetate (2-PEA) (Table 2). Aggelopoulos *et al.* (2014) observed that isoamyl acetate, phenyl ethyl alcohol (2-PE) and ethyl alcohol could be produced from the mixture of food waste including orange pulp, molasses, potato pulp, whey, brewer's spent grains using *K. marxianus* IMB3 with solid state fermentation. Major aroma compounds produced by *K. marxianus* changed depending on the fermentation medium composition also stated by Medeiros *et al.* (2000), previously. When yeast extract and glucose were used as major nutrient compounds by different strains

of *K. marxianus*, strain-to-strain variations were also observed for the overall profile of major aroma compounds (Gethins *et al.* 2015). When striving to produce particular flavor compounds, those characteristics can be considered for proper strain selection.

When we consider the effect of nutrient sources on production of flavor compounds individually, ethanol production was affected by both yeast extract and glucose concentrations in the medium. Increasing the initial YE concentration decreased the production level of ethanol by *K. marxianus*. On the contrary, increasing concentration of glucose enhanced the ethanol production in the fermentation medium ($p < 0.01$). Nitrogen-limited growth can regulate yeast metabolism and provoke ethanol formation at aerobic conditions stated by Löser *et al.* (2015), previously. Similarly, YE and glucose had a significant effect on the production of fusel alcohols (2-PE and isoamyl alcohol) by *K. marxianus*. Unlike the ethanol production, increasing both the initial YE and glucose concentrations in the fermentation medium favored the production of fusel alcohols. Similarly, significant effect of glucose on aroma production was previously reported for *K. marxianus* strain in solid-state fermentation (Medeiros *et al.* 2000). The aroma production was strongly inhibited in the absence of glucose suggesting that glucose was the main factor controlling the production reported by Medeiros *et al.* (2000). On the other hand, it was concluded that the carbon source (glucose, fructose and lactose) did not have a major effect on the production of fusel alcohols (Gethins *et al.* 2015; Fabre *et al.* 1998). However, the stimulating effect of yeast extract was also observed by Gethins *et al.* (2015) on production of fusel alcohols; the levels of both alcohols were the highest when yeast extract as opposed to ammonium sulphate or peptone was the nitrogen source. 2-PE has been subject to detailed study in *K. marxianus* (Etschmann *et al.* 2003; 2004). It is widely used in the flavor industry because of its pleasant rose-like aroma and sweet taste and important fragrance in the perfume industry. In this study, concentration of 2-PE varied between 440 and 1645 µg L⁻¹ in flasks (Table 2). The maximum concentrations of 2-PE in tomato and pepper pomace fermented by *K. marxianus* in shake flask conditions were reported as 201 µg kg⁻¹ and 79 µg kg⁻¹, respectively (Guneser *et al.* 2015). Concentrations of 2-PE produced by different strains of *K. marxianus* in medium containing glucose and yeast extract changed also between 450 and 740 µg L⁻¹ (Gethins *et al.* 2015). Additionally, the concentration of isoamyl alcohol which was the major volatile compound produced in all flasks changed between 1299 µg L⁻¹ and 3996 µg L⁻¹ in the present study. It is clear that the most important factor influ-

encing both fusel alcohol productions is the strain used, nature and concentration of substrates utilized, C/N ratio and the combination of factors (Fabre *et al.* 1998; Etschmann *et al.* 2004; Yilmaztekin *et al.* 2013). Since the fusel alcohols are the product of amino acid and sugar metabolism, conditions which promote yeast growth such as high level of nutrients especially glucose may increase the production of fusel alcohols (Vidal *et al.* 2013; Yilmaztekin *et al.* 2013). This may explain high production levels of fusel alcohols by *K. marxianus* in this study of which medium consisted of yeast extract, ammonium sulphate and glucose as nutrients.

According to the implemented design, the effects of yeast extract and glucose on acetate esters production were significant ($p < 0.05$). Two different types of nitrogen sources affected differently on the production of esters by *K. marxianus*. Increasing concentration of yeast extract in the growth medium decreased the production of esters, whereas ammonium didn't have any effect on synthesis of those compounds. On the other hand, glucose was favoring the ester production. For acetate esters, a carbon or nitrogen content higher than that in standard fermentation medium is correlated with greater acetate ester production reported by Saerens *et al.* (2008). The rate of ester formation during fermentation depends on the availability of the two substrates (acetyl-CoA and amyl alcohols) and the activity of enzymes (alcohol acetyl transferase (AATase)) (Yilmaztekin *et al.* 2013). Loughlin *et al.* (2015) mentioned that repressing effect of ammonium on the production of 2-PEA and interpreted as ammonium may act to repress the activity of AATase. On the other hand, no significant effect of nitrogen source on production of isoamyl acetate or ethyl acetate has been described by same researchers. The major acetate ester compound produced in all flasks was ethyl acetate with the concentration range 1558 to 3122 $\mu\text{g L}^{-1}$ in this study (Table 2). Those values are comparable or even higher than those previously reported in literature with *K. marxianus* strains, e.g. 432 $\mu\text{g kg}^{-1}$ with immobilized cell on appleberry/chokeberry pomace (Wilkowska *et al.* 2014), and with four strains of *K. marxianus* grown in synthetic media, using variety of carbon and nitrogen sources (Gethins *et al.* 2015). The maximum concentrations of 2-PEA and isoamyl acetate (3276 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 761 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively) after 24 h cultivation were also higher than those reported in defined media enriched with different carbon and nitrogen sources (Gethins *et al.*, 2015) and on tomato and pepper pomace medium (Guneser *et al.* 2015) and also on appleberry/chokeberry pomace and appleberry/cranberry pomaces (Wilkowska *et al.* 2014). The ester profile is highly strain dependent and strongly affects the perception of the flavor of the food product produced by yeast, especially in breweries (Rojas *et al.*

2001; Saerens *et al.* 2008). Hence, the regulation of the ester levels by nutritional variables for different yeast strains is important from this point of view. In this study, the total volatile formation was considerably higher than for *K. marxianus* cells grown on agricultural waste mediums (Wilkowska *et al.* 2014; Guneser *et al.* 2015).

Batch Cultivation in 5 L Stirred Tank Bioreactor

The optimized conditions (yeast extract 6 g L^{-1} , ammonium sulphate 6 g L^{-1} , glucose 40 g L^{-1}) were applied to aerobic bench-top bioreactor (5 L) for maximizing the production of flavor compounds by *K. marxianus*. Main objective of this part was to follow the process of volatile flavor compounds accumulating during the growth of yeast in the bioreactor and to compare the production levels occurred in flasks and the bioreactor condition.

K. marxianus cells at first exhibited exponential growth (Figure 1), but the duration of exponential growth was short (the first 9 h of cultivation). Meanwhile, cells grew with a specific growth rate (μ) of 0.39 h^{-1} and a growth yield ($Y_{x/s}$) of 0.33. After this period, the biomass concentration increased linearly with time which was most probably as a result of an undefined nutritional limitation. The growth behavior of the yeast on semi-defined medium was compatible with the findings of several studies conducted with *K. marxianus* and other yeast strains (Duarte *et al.* 2008; Guneser *et al.* 2015; Löser *et al.* 2015). The glucose was entirely depleted and cells also entered the stationary phase after the fermentation time of 24 h. The biomass productivity was 0.24 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ which was 2 fold higher than those obtained with shake flasks (0.12 $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) with the same medium composition. The growth on a glucose ($Y_{x/s}$) seemed to be slower than other *K. marxianus* strain grown on glucose, whereas this value was almost similar for growth on the remaining sugars (Fonseca *et al.* 2013). This is probably a consequence of the difference between the initial glucose levels of studies. This might decrease the rate with which the substrate is metabolized. Variations of medium pH with time were also depicted in Figure 1. The medium pH decreased with time within the first 12 h and reached a steady level around pH 3.8. Generally, the initial pH of around 5.0-6.0 was considered as the most suitable one for the growth and the production of volatile metabolite by the yeast (Kargi & Ozmihci, 2006).

Ethanol production attained the peak value of 741.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ during the fermentation time between 6 and 9 h, i.e., the exponential phase of the process. The increase in glucose consumption by the cells during this period may have been responsible for the increase in production of ethanol which was also the same for growth on lactose (Zafar & Owais,

2006). Fermentation time had significant effect on the concentration of volatile compounds which were produced in bioreactor ($p \leq 0.01$). The exponential growth of cells was accompanied by more rapid accumulation of ethyl acetate, fusel alcohols (isoamylalcohol and 2-PE) and 2-PEA than other volatile compounds in the fermentation broth (Table 3). Concentrations of all volatile compounds reached their maximum levels at 9 h fermentation time and remained almost in the same range with slight increases and decreases for some compounds at 12 h cultivation in bioreactor. After 12 h fermentation, concentrations of all volatiles except 2-

PE and isoamyl acetate decreased rapidly (Table 3). There was no significant difference in the level of isoamyl acetate and a slight decrease in the concentration of 2-PEA until the end of the fermentation. Significant decreases in the concentrations of all volatiles were also observed before through the fermentation (Medeiros *et al.* 2000; Guner *et al.* 2015). Decreases in the concentrations of volatile compounds during the production in a bioreactor can be ascribed to the losing them from liquid culture medium via exhaust gas in aerated cultivation system which is known as stripping effect (Urit *et al.* 2013a; 2013b; Guner *et al.* 2015).

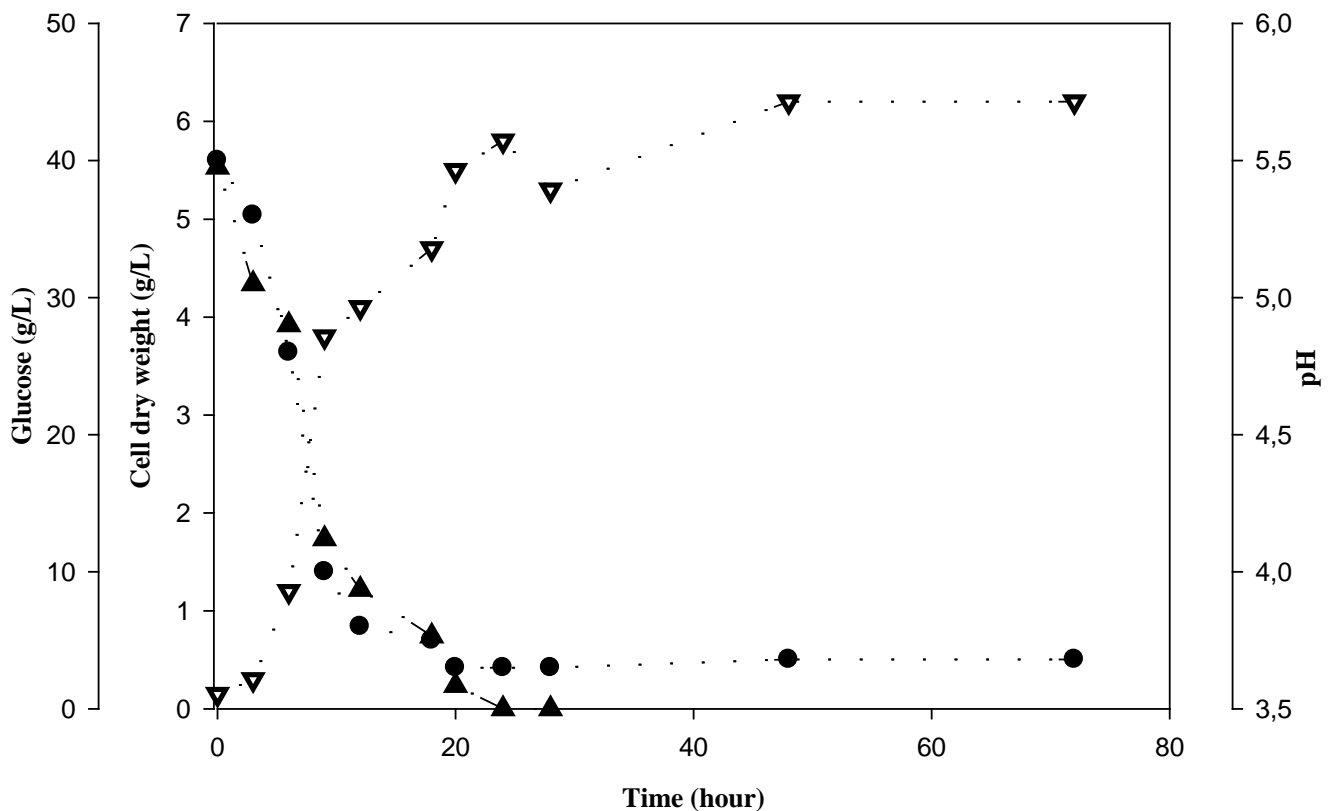


Figure 1. Growth, glucose consumption and pH changes of *K. marxianus* grown in a 5 L stirred tank bioreactor. Cell dry weight (g L^{-1} , Δ), glucose consumption (g L^{-1} , \blacktriangle), pH (\bullet).

Table 2. Central composite design plan in actual value and observed responses (cell dry weight, g L⁻¹; flavor compounds, µg L⁻¹)

Runs	X ₁	X ₂	X ₃	Cell dry weight (g L ⁻¹)	Ethanol	Ethyl acetate	Isoamyl Alcohol	Isoamyl acetate	Phenylethyl alcohol	Phenylethyl acetate	Phenylethyl propanate
1	20	6	12	2.2	530	1900	3248	463	1080	903	121
2	13	13	49.5	3.3	1077	2173	3497	624	1272	1728	220
3	20	20	12	1.6	468	2185	2869	300	1008	1126	151
4	13	24.8	26	2.5	836	2277	3604	562	1270	1408	144
5	13	13	26	2.45	741	2157	2965	481	805	1080	137
6	13	13	26	2.65	844	2222	3410	615	1254	1539	204
7	24.8	13	26	2.70	638	2006	2813	425	1552	1489	167
8	6	20	12	1.05	1061	2233	2506	455	841	1346	119
9	13	13	26	2.3	823	2158	3458	570	1283	1383	164
10	6	6	40	2.95	1224	3122	3692	761	1645	3276	245
11	6	6	12	1.45	990	2298	2701	558	1143	1471	139
12	13	13	26	2.3	618	1784	2668	475	1225	1355	128
13	1.2	13	26	1.1	1527	2453	1617	733	771	2346	80
14	20	20	40	3.75	1009	2166	4088	601	1562	2151	166
15	13	13	26	2.2	750	2160	3000	570	1220	1300	140
16	20	6	40	3.85	989	2199	3996	640	1555	2211	202
17	6	20	40	2.3	1156	2001	2409	487	936	1879	92
18	13	13	2.5	0.4	105	1558	1299	311	440	632	45
19	13	1.2	26	3.25	654	2025	3200	504	1469	1483	168
20	13	13	26	2.5	750	2000	3000	570	1220	1103	140

Table 3. Flavor compounds produced by *K. marxianus* in optimized medium during bioreactor fermentation

Aroma compound	Concentration of aroma compound (µg L ⁻¹) (Mean±SE)							
	Fermentation time (h)							
	6	9	12	18	24	48	72	Pre*
Ethanol	214.5±9.5 ^D	741.5±21.5 ^A	740.0±8.0 ^A	591.0±9.0 ^B	577.0±11.0 ^B	325.5±5.5 ^C	117.0±3.0 ^E	991.4
Ethyl acetate	1607.5±19.5 ^A	946.0±14.0 ^B	743.0±22.0 ^C	371.0±7.0 ^D	257.5±10.5 ^E	143.5±4.5 ^F	31.0±6.0 ^G	2864.5
Isoamyl alcohol	1164±15.0 ^E	2568±14.5 ^B	2726.0±14.5 ^A	1871.0±12.0 ^C	1701.0±31.0 ^D	893.5±6.5 ^F	421.5±13.5 ^G	3202.5
Isoamyl acetate	121.5±3.5 ^B	215.5±8.5 ^A	196.0±16.0 ^A	177.5±2.5 ^{0A}	175.0±3.0 ^A	202.5±5.5 ^A	110.5±7.5 ^B	716.1
Phenylethyl acetate	639.0±2.0 ^E	1149.0±4.0 ^A	1089.0±7.5 ^B	862.0±3.0 ^C	731.5±3.5 ^D	400.5±4.5 ^F	383.5±1.5 ^F	2901.1
Phenylethyl alcohol	350.5±17.5 ^E	1847.0±22.5 ^A	1808.0±8.0 ^A	1463.5±17.5 ^C	1625.5±9.5 ^B	1433.0±6.0 ^{CD}	1379.0±3.0 ^D	1359.3
Phenylethyl propanate	12.5±2.5 ^D	109.0±2.0 ^A	102.5±5.5 ^{AB}	98.5±1.5 ^{AB}	90±3.0 ^B	64.5±3.5 ^C	69.5±2.5 ^C	228.6

SE standard error

^{A-G} Means followed by different uppercase letters represent significant differences for fermentation time in each aroma compound (P ≤ 0.01).

*Results predicted for the same medium composition according to statistical design for 24 h cultivation.

Here, it was important to state oxygen was rapidly consumed by the cells after 3 h (data not shown) and there was only mechanical agitation (120 rpm) during the production. Previous findings have related the increase in the ethyl ester production (ethyl hexanoate, octanoate and decanoate) with the limited oxygen supply (Mantzouridou & Paraskevopoulou, 2013). When the culture was shifted from aerobic to oxygen-limited cultivation, the specific production rate of

ethyl acetate increased more than 10-fold stated also by Passoth *et al.* (2006). Contrary to the mentioned results, Rojas *et al.* (2001) demonstrated that low levels of acetate esters were found when non-*Saccharomyces* yeast strains were grown under minimally aerobic conditions. The maximum concentration of ethyl acetate was reached at 6 h of cultivation with 1607.5 µg L⁻¹ (Table 3), was 2 to 8 times higher compared to the values obtained before with longer fermentation periods (Medeiros *et al.* 2000; Wilkowska *et al.* 2014; Loughlin *et al.* 2015). Ethyl acetate is derived from carbon

metabolism (Morrissey *et al.* 2015). As might be expected, the stimulating effect of glucose on the production of ethyl acetate was also observed by this study during the exponential phase of cells. In the following three hours (until 9 h), although the level of ethanol known as a substrate for ethylacetate synthesis increased 4 times, the level of ethyl acetate rapidly dropped to $913 \mu\text{g L}^{-1}$ and continued to its decrease through the fermentation. This is probably a consequence of high volatility of ethylacetate and hence inevitably discharged from the aerated system (Urit *et al.* 2013a; 2013b).

The isoamyl alcohol was the major compound produced in the bioreactor which was also the same in flask cultures. Then, 2-PE and 2-PEA were following volatile compounds with high concentrations. The production of fusel alcohols were significantly enhanced between 6 - 9 h cultivation and then continued by a slight increase until 12 h cultivation ($1809 \mu\text{g/L}$). The production of fusel alcohols is known as growth-associated but the process is subject to product inhibition by the higher alcohols (Etschmann *et al.* 2003; Yilmaztekin *et al.* 2013). After 12 h cultivation, the concentration of 2-PE decreased slightly until end of the fermentation.

According to CCD, as shown in Table 3, predicted 2-PE amounts in the fermentation broth was $1360 \mu\text{g L}^{-1}$ after 24 h cultivation. However, the productivity for 2-PE was higher than this value in bioreactor. Although, the production of acetate esters is not only depend on the concentration of fusel alcohols in the medium, it was surprising to have very low levels of isoamyl acetate and phenylethyl acetate in bioreactor compared to expected values. This situation was also similar for *D. hansenii* grown on pepper pomace (Guneser *et al.* 2015). Acetate esters are recognized as important flavor compounds in fermented beverages. The characteristic fruity flavors of wine and other grape-derived alcoholic beverages are primarily due to a mixture of those esters. Yeast strain and fermentation conditions have significant effects on levels of higher alcohols and acetate esters (Rojas *et al.* 2001). Under semiaerobic conditions, concentrations of acetates peaked and then decreased, probably as a result of their hydrolysis under the action of cellular esterases, the activity of which increases at the end of fermentation (Yilmaztekin *et al.* 2013). Confirming this research, the concentrations of all acetate esters maximized at the end of exponential growth under minimally aerobic conditions and then decreased through the fermentation in this study.

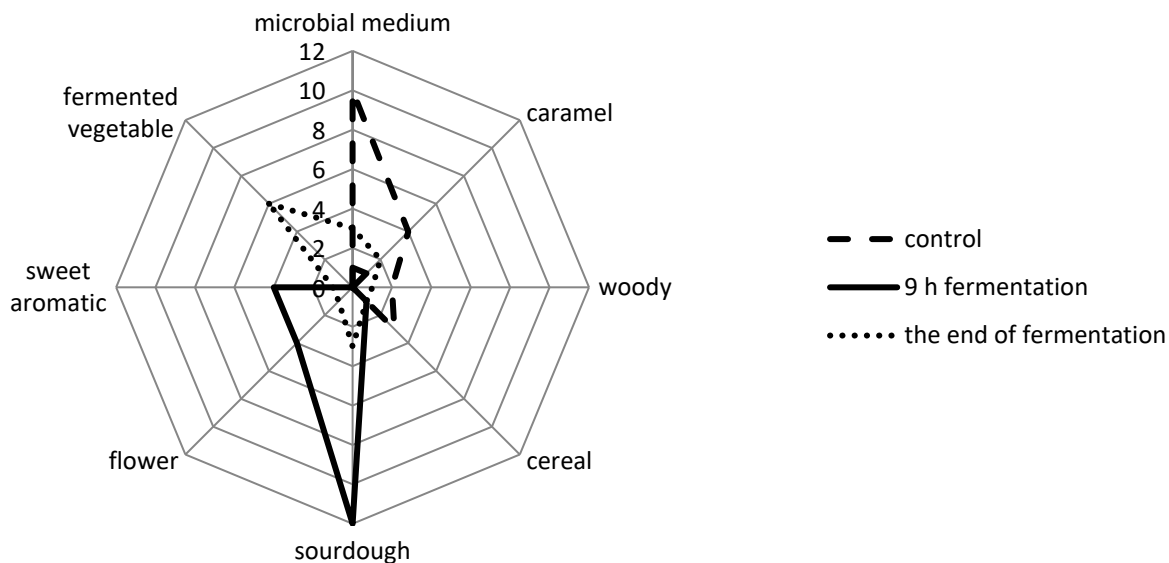


Figure 2. Descriptive aroma terms of volatile flavor and fragrance compounds produced in the bioreactor.

Sensory Analysis of Aroma Compounds Produced by K. marxianus During the Production in a Bioreactor

Sensory analysis is the most powerful tool for interpreting the relationship between quantity of flavor compound and its sensory perception (Guneser *et al.* 2015). Therefore, descriptive sensory analysis was also conducted in the present study. Totally eight descriptive aroma terms were developed by panelists. They were broth-like, cereal, caramel, woody, sourdough, flower, sweet aromatic, and fermented vegetable. Figure 2 shows the mean intensities of descriptive sensory terms for control sample and samples at 9 h fermentation time (at which the amount of volatiles were highest) and the end of fermentation. It was observed that there were significant differences between samples in terms of caramel, fermented, flower and sweet aromatic aromas ($p \leq 0.01$). Control sample had the higher broth-like, caramel, cereal aromas than other samples, whereas sample at 9 h had higher sourdough, flower and sweet aromatic aromas than control and the sample belonging to end of fermentation. It was also found that the sample belonging to end of fermentation had the highest fermented vegetable aroma than others. These results proved that the changes in aroma profiles owing to the production of volatile flavor compounds by *K. marxianus* during the production in bioreactor. It was also revealed that sweet aromatic and caramel aromas were related to isoamyl acetate and phenylethyl propanate by multidimensional scale analysis (data not shown).

Conclusion

In conclusion, the optimization of nitrogen and carbon sources in culture medium of *K. marxianus* led to obtain higher biomass productivities and the right balance between the growth of yeast and synthesis of volatile flavor compounds compared with previous studies. It was also important to note that the strain of *K. marxianus* studied in this work produced mainly ethyl acetate (fruity), isoamyl alcohol (banana), 2-phenylethyl acetate (floral) on a medium with a semi-defined composition. Results obtained during this work indicated that the growth of yeast and level of flavor components depended on the nature and the concentration of nutrients. It was revealed that ammonium sulphate which was generally used nitrogen source in previous researches was not necessary for the growth in the presence of yeast extract. Yeast extract seemed to be preferentially assimilated by the organism. This study also allowed to the regulation of the level of target volatile compounds according to the nutritional requirements of yeast. Furthermore, it was presented that highest productivity values for major volatile compounds were obtained during the exponential growth of the yeast. Therefore, further improvement in the

level of flavor compounds may be obtained by employing suitable nutrient feeding strategies (fed-batch, repeated fed-batch, continuous systems) during the production in bioreactor. This work also demonstrated high product losses due to the stripping effect when the production scaled up from shaking flask to bioreactor. Hence, in situ recovery of the volatile products can improve the productivity of the bioprocess considerably. Because of its volatile compound profile (mainly acetate esters and fusel alcohols) and ability also to grow on a broad variety of substrates, at higher temperatures and rapid growth rates, *K. marxianus* can be used as starter cultures for various fermented foods especially beverages.

Acknowledgements

The author would like to express her thank to Prof. Dr. Yonca Karagul Yuceer (Department of Food Engineering, Canakkale Onsekiz Mart University, Canakkale, Turkey) for her scientific assistance with GC-MS analysis and valuable comments and suggestions during the preparation of this manuscript and wish to thank to Assoc. Prof. Dr. Onur Guneser (Department of Food Engineering, Usak University, Usak, Turkey) for his scientific assistance and valuable comments throughout the research and the preparation of this manuscript.

References

- Aggelopoulos, T., Katsieris, K., Bekatorou, A., Pandey, A., Banat M.A., Koutinas A.A. (2014). Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, 145, 710-716.
- Berger, R.G. (2015). Biotechnology as a source of natural volatile flavours. *Current Opinion in Food Science*, 1, 38-43.
- Box, G.E.P., Behnken, D.W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
- Doran, P. (1999). Bioprocess engineering principles. Academic, London, UK. p. 207-208. ISBN 0122208552
- Etschmann, M.M.W., Sell, D., Schrader, J. (2003). Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. *Biotechnology Letters*, 25, 531-536.
- Duarte, L.C., Carvalheiro, F., Lopes, S., Neves, I. & Girio, F.M. (2008). Yeast biomass production in brewery's

- spent grains hemicellulosic hydrolyzate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 148, 119-129.
- Etschmann, M.M.W., Sell, D., Schrader, J. (2004). Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 29, 187-193.
- Fabre, C.E., Blanc, P.J., Goma, G. (1998). Production of 2-phenylethyl alcohol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Progress*, 14, 270-274.
- Fonseca, G.G., de Carvalho, N.M., Gombert, A.K. (2013). Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 5055-5067.
- Garrido-Vidal, D., Pizarro, C., Gonzalez-Saiz, J. M. (2003). Study of process variables in industrial acetic fermentation by a continuous pilot fermentor and response surfaces. *Biotechnology Progress*, 19, 1468-1479.
- Gethins, L., Guneser, O., Demirkol, A., Rea, M.C., Stanton, C., Ross, R.P., Yuceer, Y., Morrissey, J.P. (2015). Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavor metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 32, 67-76.
- Guneser, O., Demirkol, A., Karagül-Yüceer, Y., Ozmen-Togay S., Isleten-Hosoglu, M., Elibol, M. (2015). Bioflavour production from tomato and pepper pomaces by *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii*. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, 38, 1143-1155.
- Isleten-Hosoglu, M., Gultepe, I., Elibol, M. (2012). Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. *Biochemical Engineering Journal*, 61, 11-19.
- Janssens, L., de Pooter, H.L., Schamp, N.M., Vandamme, E.J. (1992). Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry*, 27, 195-215.
- Kargi, F., Ozmihci, S. (2006). Utilization of cheese whey powder for ethanol fermentations: effects of operating conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 711-718.
- Loughlin, G., Guneser, O., Demirkol, A., Rea, M.C., Stanton, C., Ross, R.P., Yuceer, Y., Morrissey, J.P. (2015). Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 32, 67-76.
- Löser, C., Urit, T., Gruner, E., Bley, T. (2015). Efficient growth of *Kluyveromyces marxianus* biomass used as a biocatalyst in the sustainable production of ethyl acetate. *Energy, Sustainability and Society*, 5, 2-15.
- Mackay, D., O'Mahony, M. (2002). Sensory profiling with probabilistic multidimensional scaling. *Journal of Sensory Studies*, 17, 461-481.
- Mandenius, C.F., Brundin, A. (2008). Bioprocess optimization using design of experiments methodology. *Biotechnol Progress*, 24, 1191-1203.
- Manera, A.P., da Costa Ores, J., Ribeiro, V.A., Burkert, C.A.V., Kalil, S.J. (2008). Optimization of the culture medium for the production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* cct 7082. *Food Technology and Biotechnology*, 46, 66-72.
- Mantzouridou, F., Paraskevopoulou, A. (2013). Volatile bio-ester production from orange pulp-containing medium using *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 3326-3334.
- Medeiros, A.B.P., Pandey, A., Freitas, R.J.S., Christen, P., Soccol, C.R. (2000). Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 33-39.
- Meilgaard, M., Civille, G.V., Carr, B.T. (1999). Descriptive analysis techniques. In Meilgaard M, Civille GV, Carr BT (eds) *Sensory evaluation techniques*, 3rd edn. CRC Press, Boca Raton. ISBN 9781439832271
- Morrissey, J.P., Etschmann, M.M.W., Schrader, J., de Billerbeck, G.M. (2015). Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavor and fragrance molecules. *Yeast*, 32, 3-16.

- Panesar, P.S. (2008). Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 91-96.
- Parrondo, J, Garcia, L.A., Diaz, M. (2009). Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose-added whey. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 26, 445-456.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U.A., Schnurer, J. (2006). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, 6, 3-13.
- Pawliszyn, J. (2012). Theory of solid phase microextraction. In: Pawliszyn, J. (ed.) *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier Inc., Waltham, USA. ISBN 978-0-12-416017-0
- Rojas, V., Gil, J.V., Pinaga, F., Manzanares, P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 283-289.
- Saerens, S.M., Delvaux, F., Verstrepen, K.J., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 454-461.
- Tanyol, M., Uslu, G., Yönten, V. (2015). Optimization of lipase production on agroindustrial residue medium by *Pseudomonas fluorescens* (NRL B-2641) using response surface methodology. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29, 64-71.
- Urit, T., Li, M., Bley T. (2013a). Growth of *Kluyveromyces marxianus* and formation of ethyl acetate depending on temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 10359-10371.
- Urit, T., Urit, T., Manthey, R., Bley, T., Löser, C. (2013b). Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: influence of aeration and inhibition of yeast growth by ethyl acetate. *Engineering and Life Science*, 13, 247-260.
- Vidal, E., de Billerbeck, G.M., Simoe, D.A., Schuler, A., François, J.M., de Morais, M.A. (2013). Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaça fermentation. *Food Chemistry*, 138, 701-708.
- Wilkowska, A., Kregiel, D., Gunecer, O., Karagul Yuceer, Y. (2014). Growth and by-product profiles of *Kluyveromyces marxianus* cells immobilized in foamed alginate. *Yeast*, 32, 217-225.
- Winer, B.J., Brown, D.R., Michels, K.M. (1991). *Statistical Principles in Experimental Design*, 3rd Ed. McGraw-Hill, New York. ISBN 978-0070709829
- Yilmaztekin, M., Cabaroglu, T., Erten, H. (2013). Effects of fermentation temperature and aeration on production of natural isoamyl acetate by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. *BioMed Research International*, 2013, 1-6.
- Yuceer, K.Y., Isleten, M., Pala, C. (2007). Sensory characteristics of ezine cheese. *Journal of Sensory Studies*, 22, 49-65.
- Zafar, S., Owais, M. (2006). Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. *Biochemical Engineering Journal*, 27, 295-298.



THE SUPPLEMENTARY EFFECT OF BLACK AND GREEN TEA INFUSION ON ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF KEFIR

Cem Karagözlü , Gülfem Ünal , A. Sibel Akalın , Ecem Akan , Özer Kınık 

Cite this article as:

Karagözlü, C., Ünal, G., Akalın, A.S., Akan, E., Kınık, Ö. (2018). The Supplementary Effect of Black and Green Tea Infusion on Antimicrobial Activities of Kefir. Food and Health, 4(2), 124-131. DOI: 10.3153/FH18012

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü Bornova, İzmir, Türkiye

ABSTRACT

The influence of supplementation with green and black tea on microbiological properties and antimicrobial activities of kefir was investigated during 21 days of storage. The samples supplemented with 2% either green or black tea had higher viable counts of both kefir cultures than those of supplemented with the ratio of 4%. Both green and black tea extracts showed antimicrobial activity on *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* however this effect was detected higher in samples containing green tea.

Keywords: Green tea, Black tea, Kefir, Antimicrobial, Viability

Submitted: 10.07.2017

Accepted: 11.11.2017

Published online: 22.01.2018

Correspondence:

Cem KARAGÖZLÜ

E-mail: cem.karagozlu@ege.edu.tr

©Copyright 2018 by ScientificWebJournals

Available online at

www.scientificwebjournals.com

Introduction

Tea (*Camellia sinensis*, family Theaceae) is commonly consumed worldwide having various health benefits and physiological functionalities, such as antioxidative, anticarcinogenic and antimicrobial effects (Michalczyk & Zawislak 2008; Chan et al 2011; Archana & Abraham 2011). The most important bioactive substances responsible for these health effects present in tea are tea polyphenols. Tea catechins are the major components of polyphenols, which consist of (-)-epigallocatechin gallate (ECg), (-)-epicatechin (EC), and their epimerization isomers (+)-gallocatechin gallate (GCg), (+)-gallocatechin (GC), (+)-catechin gallate (Cg), and (+)-catechin (C) (Goto et al 1996). The antimicrobial activity of tea which inhibit many undesired microbial growth are mainly related to their polyphenolic components (Michalczyk & Zawislak 2008). The extracts of *Camellia sinensis* have been determined to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* and *Bacillus cereus* in many studies (Chan et al 2011; Archana & Abraham 2011; Kumar et al 2012; Inamdar et al 2014).

In recent years, different ingredients have been used to improve the therapeutic benefits and some functional properties of kefir. Green and black teas were used because of their benefits to human health and their popular consumption worldwide in some dairy products such as milk, yoghurt, fermented milk and some other probiotic dairy products (Jaziri et al 2009; Najgebauer-Lejko et al 2011; Marhamatizadeh et al 2013; Ye et al 2013; Najgebauer-Lejko 2014; Ma et al 2015).

The objective of this study was to investigate the viability of kefir microorganisms, antimicrobial properties in presence of two different ratios (2% or 4%) green and black teas during refrigerated storage.

Materials and Methods

Material

UHT cow's milk used in the studies obtained from Pinar Sut Co. (Izmir, TURKEY). Commercial freeze-dried kefir starter culture containing *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* spp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris*, *Lactobacillus kefir*, *Kluyveromyces marxianus*, and *Saccharomyces unisporus* spp. obtained from Danisco DC – Kefir (Olsztyn, Poland). Green tea (Kardelen) and black tea (Caykur 1. Nevi) leaves were purchased from Caykur Co. (Rize, Turkey). Foodborne pathogens and spoilage microorganisms (*Escherichia coli* CECT 4267, *Bacillus cereus* CECT 131, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Candida*

albicans ATCC14053) for antibacterial activity were obtained from the collection Department of Dairy Technology (Ege University, Izmir, Turkey).

Methods

Production of Kefir: The freeze dried kefir culture was propagated by inoculating in skim milk which was heated at 90 °C for 30 min before the inoculation. The inoculated milk was incubated at 25°C until pH 4.6 was reached, then stored overnight at 4°C in refrigerator. The whole milk was heated to 85 °C and waited for 10 min, then fortified with green or black tea at levels of 2% and 4% (w/v). The teas were infused for 10 min then different batches were filtered through sterile cotton to remove the particles. The milk samples were then cooled to 25 °C and inoculated 3% kefir culture and divided into 200 mL plastic containers and incubated at 25 °C until pH 4.6 was reached. Following the fermentation, the samples were cooled and stored at 4 °C for 21 days for the analyses. Five different beverages were produced: CK: control kefir, 2BK: kefir supplemented with 2% black tea, 4BK: kefir supplemented with 4% black tea, 2GK: kefir supplemented with 2% green tea, 4GK: kefir supplemented with 4% green tea.

pH analyses: The pH was determined with a pH meter (Hanna pH 211 Microprocessor, Portugal).

Microbiological analyses: Lactobacilli counts in kefir samples were enumerated in MRS agar (pH 5.8) (Merck/1.10660, Darmstadt, Germany) via anaerobic incubation at 42°C for 48 h; whereas Lactococci in the kefir samples were counted in M17 agar (pH 6.9) via aerobic incubation at 37°C for 48 h. Yeasts were enumerated using YGC Agar (pH 6.8) via incubation at 25°C for 72 h (Merck Kga A, Darmstadt, Germany) and incubated (Bracquart, 1981).

Antimicrobial activity: Antibacterial susceptibility testing was done by using disc diffusion method (Radji et al 2013). To check antimicrobial activity of samples, sterile tripton soy agar plates were used. Tripton soy agar was prepared and autoclaving at 121°C for 15 minutes. The medium was poured in sterile petri plates under aseptic conditions. Then allowed the media to solidify at room temperature and stored at 4°C until use. After solidification, 0.2 ml of inoculum suspension was inoculated with micropipette and spread uniformly with sterile glass spreader over agar surface, the inoculum was allowed to dry for 5 minutes. 50µl concentration of samples was loaded on sterile individual discs. The loaded discs were placed on the surface of medium and the sample was allowed to diffuse at least for 5 minutes. The plates were kept for incubation at 37°C for 24-48 h. Methanol, ethanol and distilled water were used as

negative control. Plates were observed after 24-48 h incubation for appearance of zones of inhibition around the discs. Antimicrobial activity was evaluated by measuring diameter of zones of inhibition (in millimeters) of microbial growth.

Statistical Analysis: The experiments were performed in twice with three parallel. Six values for each sample were averaged ($n=6$). The data obtained was processed by one-way ANOVA using the general linear model procedure of the SPSS version 11.05 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The means were compared with the Duncan test at $p<0.05$ level.

Results and Discussion

Changes in pH values

pH values of kefir samples produced from milk fortified with black and green tea infusion at different ratios and the changes in these values during storage are given in Figure 1. pH value of the samples varied between 4.38 and 4.66. The changes in pH values of our samples in terms of storage and black and green tea fortification ratios were statistically significant ($p<0.05$). These results are similar to those obtained in other studies (Irigoyen et al. 2005; Fontan et al. 2006). It was reported that the quality of the milk, dry matter content, the diversity of microorganisms that constitute the kefir culture, kefir production technologies, fermentation temperature, fermentation duration and the time from production to consumption were effective on the composition of kefir (Güzel-Seydim et al. 2005). Najgebauer-Lejko (2014), in their study on bioyogurt and acidophilus milk fortified with

green tea infusion at different ratios, reported that the pH values of biyogurts and acidophilus milks were slightly higher in samples with higher levels of green tea supplementation.

Microbiological Properties

The changes in *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. and yeast counts of kefir samples containing green and black tea extracts during storage are given in Table 1. *Lactococcus* spp. counts of kefir samples produced by blending with 2% and 4% green and black tea extracts varied between 8.87 log cfu/mL and 8.72 log cfu/mL on the 1st day of the storage period. Although there were no significant differences between the samples on the 1st day, *Lactococcus* spp. counts in the samples containing tea extracts were slightly lower. There were significant decreases in *Lactococcus* spp. counts related to both the storage period and the rate of green/black tea extract fortification ratios. *Lactococcus* spp. counts determined in kefir samples at the 21st day of the storage varied between 6.44 log cfu/mL and 6.76 log cfu/mL.

Lactobacillus spp. counts of kefir samples ranged between 8.71 log cfu/mL and 8.86 log cfu/mL on the 1st day of storage whereas the values changed between 6.31 log cfu/mL and 6.70 log cfu/mL on the 21st day of storage. In the evaluation of all the results, although there were no significant differences between *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. counts found in the traditional kefir culture, there were substantial decreases related to the storage period and the ratio of tea extracts.

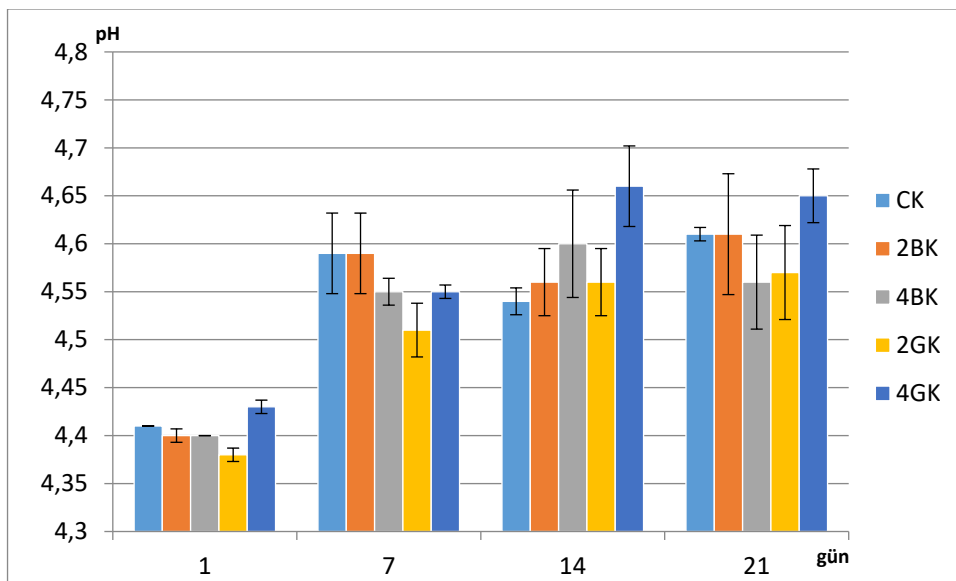


Figure 1. Changes in pH during 21 days of storage in kefir samples.

Table 1. The changes in *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. and yeast counts of kefir samples during storage

	DAY	CK	2BK	4BK	2GK	4GK
Yeast	1	5.53±0.08 ^B	5.59±0.03 ^A	5.59±0.02 ^A	5.55±0.03 ^A	5.54±0.02 ^A
	7	5.47±0.03 ^B	5.43±0.03 ^A	5.33±0.03 ^A	5.34±0.06 ^A	5.29±0.06 ^B
	14	5.39±0.04 ^{aB}	4.54±0.07 ^{cB}	4.94±0.02 ^{bB}	4.52±0.04 ^{cB}	4.36±0.02 ^{dC}
	21	6.56±0.04 ^{aA}	3.81±0.01 ^{bc}	3.69±0.00 ^{bcC}	3.77±0.01 ^{bC}	3.63±0.00 ^{cD}
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	8.86±0.01 ^A	8.78±0.01 ^A	8.74±0.02 ^A	8.77±0.01 ^A	8.71±0.05 ^A
	7	8.63±0.01 ^A	8.58±0.02 ^A	8.42±0.01 ^A	8.46±0.10 ^A	8.31±0.09 ^A
	14	7.73±0.08 ^B	7.67±0.05 ^B	7.62±0.01 ^B	7.63±0.02 ^B	7.56±0.02 ^B
	21	6.70±0.07 ^C	6.51±0.01 ^C	6.38±0.05 ^C	6.48±0.03 ^B	6.31±0.01 ^C
<i>Lactococcus</i> spp.	1	8.87±0.04 ^A	8.87±0.01 ^A	8.75±0.08 ^A	8.84±0.01 ^A	8.72±0.04 ^A
	7	8.52±0.02 ^A	8.48±0.04 ^A	8.40±0.02 ^A	8.46±0.09 ^A	8.35±0.07 ^A
	14	7.67±0.01 ^B	7.63±0.03 ^B	7.51±0.01 ^B	7.60±0.12 ^B	7.48±0.06 ^B
	21	6.76±0.05 ^C	6.66±0.01 ^C	6.51±0.07 ^C	6.59±0.01 ^C	6.44±0.10 ^C

^{a-d} Means ± standard deviations in the same row with different superscript lowercase letters are significantly different (p<0.05).

^{A-D} Means ± standard deviations in the same column with different superscript uppercase letters are significantly different (p<0.05).

Evaluating all the values obtained in kefir samples, *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. have a symbiotic relation, and first *Lactococcus* spp. is active during fermentation and subsequently *Lactobacillus* spp. shows activity. While the baseline *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. counts were maintained at the first 7 days of storage, the counts began to decline on the 14th day and were found to be statistically significant. However, the differences between the *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. counts in the control sample, 2% and 4% green and black tea samples were statistically insignificant (p>0.05). This shows that 2% and 4% green and black tea additions do not affect the bacteria in kefir production.

Najgebauer-Lejko (2014) investigated the effect of using green tea extracts on the microbiological properties of bioyoghurt and acidophilus milk and found similar viability with our study. The authors determined Lactobacilli counts between 7.21 log cfu/g and 8.29 log cfu/g in bioyoghurt samples whereas the values were found between 8.72 log cfu/g and 9.02 log cfu/g in acidophilus milk samples. On the other hand, Bifidobacteria counts changed between 6.66 log cfu/g and 7.54 log cfu/g in bioyoghurt samples. The researchers indicated that the interaction between the ratio of tea extracts and the bacteria species had a significant effect on the viability. This contrariness with our study about the effect of addition of tea on bacterial counts can be due to the different types of fermented dairy product used in the studies.

In another study, Marhamatizadeh et al. (2013) investigated some properties of probiotic yoghurt, containing *L. acidophilus* and *B. bifidum*, fortified with green tea extract. The viable counts of *L. acidophilus* and *B. bifidum* in sterile low fat milks fortified with 0.3%, 0.6% and 0.9% green tea extracts were found to be higher than that of control sample. The addition rate of green tea extract significantly affected the viability of *L. acidophilus* while the highest counts were determined on 14th day of storage.

Yeasts are important in kefir fermentation because of the production of ethanol and carbon dioxide, which give the kefir drink its unique taste. The counts of yeasts did not generally alter significantly in all kefir samples during two weeks of storage (p>0.05) whereas the values statistically decreased in tea extract supplemented samples on 14th and 21st days of storage (p<0.05). Statistically significant differences were found between control sample and the samples supplemented with black or green tea in terms of yeast count (p<0.05) on 14th and 21st days of storage. Black and green tea supplemented kefir samples had lower yeast counts than that of control sample during the last two weeks of storage probably due to the suppression effect of tea on yeast viability. The yeast viability significantly decreased (p<0.05) when the ratio of green tea increased from 2% to 4% on the reported days. The yeast population level in our study were found to be lower than the enumerations reported by Wszolek et al. (2005), Witthuhn et al. (2005) and Irigoyen et al. (2005).

Consequently, it is possible to say that microorganism variety found in the fermented dairy product, the addition rate of tea extracts and also the type of tea used in the manufacture can affect the microbiological characteristics of the product. Moreover, incubation conditions, storage period, level of unwanted microflora and their enzymes, concentration of nutrients in the medium and the different phenolic compounds found in black or green tea might influence the viability of starter cultures (O'Connell & Fox, 2001; Marhamatizadeh et al., 2009; 2013).

Antimicrobial Activity

In the study, the antimicrobial effects of kefir samples containing 2% and 4% green and black tea extracts were determined on *Echerichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* pathogenic bacteria and *Candida albicans* which is a pathogenic yeast. Antimicrobial effect was determined by measuring zone diameters formed as a result of antimicrobial effect by disc diffusion method in 50 µL kefir samples containing 2% - 4% green and black tea extracts. It was found that tea extracts had antimicrobial effects on the mentioned microorganisms at both ratios and this effect was even higher in samples containing green tea extracts. Zone diameters formed by the tea extracts as a result of antimicrobial effects are shown in Table 2. In Table 2, it is seen that the highest antimicrobial effect by 2% and 4% green tea extracts were on *S. aureus*. Zone diameters varied between 12.77 mm and 9.45 mm in 2% green tea extract use and between 16.32 mm and 10.25 mm in 4% green tea extract use. Green tea extracts had a similar effect on other microorganisms and antimicrobial activity on the microorganisms from highest to lowest was sorted *B. cereus*, *C. albicans* and *E.coli*, respectively. Additionally, antimicrobial activity showed a decreasing course during storage. At the 1st day of the storage, zone diameter formed in *E. coli* in kefir samples containing 2% green tea was 9.37 mm while it was 11.15 mm in *B. cereus* and 16.35 mm in *C. albicans*. These values decreased to 6.65, 7.25 and 11.50 mm respectively at the end of the 21st day. Using 4% green tea extract significantly increased the antimicrobial activity especially at the 1st day and the zone diameters were 15.32 mm for *E. coli*, 14.50 mm for *B. cereus* and 23.52 mm for *C. albicans*. Antimicrobial activity decreased at the 21st day and the inhibitions zoned were measured to be 10.55 mm for *E. coli*, 9.65 mm for *B. cereus* and 15.32 mm for *C. albicans*.

Similar results were observed in black tea extract use, however the antimicrobial effect was lower. At the 21st day, the inhibition zones determined in kefir samples containing 2% black tea were 6.20 mm for *E. coli*, 6.87 mm for *B. cereus*, 6.65 mm for *S. aureus* and 8.15 mm for *C. albicans*. Unlike green tea extracts, the antimicrobial effect of black tea extracts on *C. albicans* was higher. Similar to those of containing green tea, significantly higher antimicrobial activity values were determined in kefir samples containing 4% black tea extracts at the 1st day, however decreased in the further days. The antimicrobial activity determined at the 21st day of the storage was 7.47 mm for *E.coli*, 6.40 mm for *B. cereus*, 8.15 mm for *S. aureus*, and 11.05 mm for *C. albicans*.

Water extracts of the tea leaves are consumed for centuries. Examining the physicochemical properties of tea leaves, it was determined that they contain alkaloids, saponins, tannins, catechins and polyphenols and tea leaves are used against microorganisms for their antimicrobial activity. The main difference between green and black tea leaves is the fermentation stage and the leaves of black tea are fermented, oxidized and then dried. However, phytochemicals found in the composition of tea are very sensitive to the oxidation stage. The studies showed that green tea extracts inhibited *S. aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* and their strains. Although green tea extracts contain 30-40% water soluble polyphenols, this level decreases to 3-10% in black tea extracts. According to the studies, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, epigallo catechin, epicatechin are considered as the most important antioxidant components and it was determined that the most important effects of these components are on entero pathogens (Archana & Abraham, 2011; Diane et al., 2007). Archana & Abraham (2011), in their study, reported that *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *C. albicans* are very sensitive to fresh green tea extracts, however the antimicrobial activity decreased in commercial green tea. Antimicrobial activity in black tea was very low and, furthermore, it had no effect on *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. Katsuhiko et al. (1999) determined that green tea extracts have antibacterial effects on *Helicobacter pylori* and reported that it has a positive effect in the treatment of gastrointestinal problems related to this bacterium.

Table 2: Antimicrobial activity of kefir samples during storage given as the diameter of inhibited zone (mm)

	DAY	CK	2BK	4BK	2GK	4GK
<i>E. coli</i>	1	6.35±0.02	7.90±0.26	11.00±0.36	9.37±0.26	15.32±0.70
	7	6.00±0.08	7.77±0.38	9.87±0.09	9.32±0.22	14.52±0.93
	14	5.17±0.17	7.15±0.10	8.52±0.12	7.57±0.05	12.15±0.35
	21	3.35±0.26	6.20±0.16	7.47±0.10	6.65±0.17	10.55±0.06
<i>B. cereus</i>	1	7.50±0.11	9.55±0.10	10.85±0.06	11.15±0.19	14.50±0.34
	7	7.75±0.29	8.92±0.09	9.60±0.37	10.67±0.15	13.85±0.05
	14	5.50±0.08	7.30±0.24	7.52±0.09	8.67±0.21	11.60±0.08
	21	4.35±0.30	6.87±0.09	6.40±0.28	7.25±0.29	9.65±0.10
<i>S. aureus</i>	1	8.15±0.19	10.40±0.16	12.65±0.24	12.77±0.33	16.32±0.21
	7	5.92±0.15	9.72±0.09	11.60±0.14	12.55±0.05	15.25±0.13
	14	4.27±0.32	8.07±0.09	9.62±0.05	10.77±0.30	11.35±0.27
	21	2.65±0.09	6.65±0.13	8.15±0.10	9.45±0.19	10.25±0.46
<i>C. albicans</i>	1	10.13±0.26	12.47±0.09	18.50±0.11	16.35±0.25	23.52±0.15
	7	9.72±0.15	11.30±0.32	16.22±0.26	15.60±0.18	21.57±0.05
	14	8.37±0.26	9.57±0.05	13.50±0.26	13.30±0.11	18.57±0.24
	21	7.40±0.16	8.15±0.10	11.05±0.37	11.50±0.26	15.32±0.09

Wu et al. (2007) reported that water extracts of various tea types including green tea showed an antimicrobial activity against *S. aureus* and *B. subtilis* at 2 mg/mL concentration, however no antimicrobial effect was observed on Gram (-) *E. coli*. On the other hand, it was stated that the level of resistance of Gram (-) bacteria against the extracts were related to the lipopolysaccharides in the cell membrane and the antimicrobial activity was higher in fresh tea leaves due to their high polyphenol content (Alzoreky & Nakahara, 2003; Negi et al., 2005; Chou et al., 1999). Kumar et al. (2012) investigated the antibacterial activity of green tea leaves against environment-originated *S. aureus*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* spp., *E. coli* and *Proteus* species with disc diffusion method. Antibacterial activity was tested at 10 UI, 20 UI and 30 UI extract concentrations, significant levels of antibacterial activity was observed in all concentrations and the inhibition zone diameters varied between 7 and 13 mm. Chou et al. (1999), in their study, investigated the antimicrobial activity of different tea types against *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*. Among the six bacteria species, the most sensitive bacterium to the extracts was *P. fluorescens* whereas the most resistant bacterium was *B. subtilis*. *E. coli*, *S. aureus*, *P. vulgaris* and *Salmonella* spp. were inhibited at similar ratios and the activity decreased in all species when fermented tea

extracts were used. Chan et al. (2011) investigated the antioxidant and antimicrobial activities of green, black and some herbal tea extracts. In the study, antimicrobial activity of tea extracts was investigated against Gram (+) *Micrococcus luteus*, *S. aureus* and *B. cereus* and Gram (-) *E. coli*, *Salmonella typhi* and *P. auregonisa* using disc diffusion method. The study showed that all extracts were effective on Gram (+) bacteria whereas they had no effect on Gram (-) bacteria. The highest antimicrobial activity in green tea extracts was against *M. luteus* and *B. cereus*, whereas the lowest was against *S. aureus*. Although black tea extracts showed a similar antimicrobial activity, they had no effect on *S. aureus*. The researchers also stated that lipoproteins and lipopolysaccharides found in the cell membranes of Gram (-) bacteria increased the resistance against antimicrobial agents.

Abd-Allah et al. (2011), in their study, investigated the antimicrobial effects of black tea and milk beverages containing black tea on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* sp. found in the oral flora. The analysis results of samples obtained from children showed that black tea and milk beverages containing black tea had a highly significant bacterial counts reduction against these cariogenic bacteria by different rates (43.6% - 83.3%). Inamdar et al. (2014), in their study, determined that water extracts of tea leaves had a strong antifungal effect on *Saccharomyces cerevisiae* and

low antifungal effect on *Candida albicans*, whereas no antifungal effect was observed on *C. tropicalis*. It was determined that the antifungal effects of alcohol extracts of teas were very high on *C. albicans* and *cerevisiae* whereas they were very low on *C. tropicalis*. It was observed that the results obtained in many studies (Archanda & Abraham, 2011; Chou et al 1999; Erol et al. 2009; Katsuhiko et al. 1999; Kumar et al. 2012; Mandal et al. 2011; Radji et al. 2013; Shetty et al. 1994) support the results obtained in the present study and varied depending on the extraction type, type of tea and the properties of microorganisms.

Conclusions

Lactobacillus ssp. and *Lactococcus* ssp. counts of kefir samples produced with 2% and 4% green and black tea was above 10^6 - 10^7 cfu / mL throughout of storage. It appears that the green and black tea addition did not adversely affect the pH values and the samples retained their probiotic properties. On the other hand, green tea improved the antimicrobial activities of kefir higher compared to black tea. This effect was stronger when the supplementation ratio increased from 2% to 4%. Therefore, fortification of kefir with green tea can be an alternative pathway to create a functional dairy product having both nutritional and health benefits.

Acknowledgement

The authors thank Ege University Scientific Research Project Council for the financial support for this research (Project no: 2011-ZRF-012).

References

- Abd-Allah, A.A., Ibrahim, M.I., Al-atrouny, A.M. (2011). Effect of Black Tea on Some Cariogenic Bacteria. *World Applied Sciences Journal*, 12(4), 552-558.
- Alzoreky, N.S., Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 223-230
- Archana, A., Abraham, J. (2011). Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(8), 149-152.
- Bracquart, P. (1981). An agar medium for the differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 51(2), 303-305.
- Chan, E.W.C., Soh, E.Y., Tie, P.P., Law, Y.P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, 3(4), 266-272
- Chou, C.C., Lin, L.L., Chung, K.T. (1999). Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *International Journal Food Microbiology*, 48, 125-130
- Diane, L. McKay D.L., Jeffrey, B.B. (2007). Roles for Epigallocatechin Gallate in Cardiovascular Disease and Obesity: An Introduction. *Journal of American College of Nutrition*, 26(4), 362S-365S.
- Erol, N.T., Sari, F., Polat, G., Velioglu, Y. S. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of various extracts and fractions of fresh tea leaves and green tea. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 15(4), 371-378
- Fontan, M.C.G., Martinez, S., Franco, I., Carballo, J. (2006). Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made from cow's milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 16, 762-767.
- Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M., Nagashima, H. (1996). Simultaneous analysis of individual catechins and caffeine in green tea. *Journal of Chromatography*, 749, 295-299.
- Güzel-Seydim, Z., Wyffels, J.T., Seydim, A.C., Greene, A.K. (2005). Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *International Journal of Dairy Technology*, 58(1), 25-29.
- Inamdar, P., Jelamvazir, D.S, Patel, D., Meshram, D. (2014). Phytochemical screening and in vitro antifungal activity of *Camellia sinensis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 148-150
- Irigoyen, A., Arana, I., Castiella, M., Torre, P., Ibáñez, F. Z. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, 90, 613-620
- Jaziri, I., Slama, M.B., Mhadhbi, H., Urdaci, M., Hamdi, M. (2009). Effect of green black teas (*Camellia sinens* L.)

- on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage. *Food Chemistry* 112: 614-620
- Katsuhiro, M., Yamada, M., Oguni, I., Takahashi, T. (1999). In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 43(7), 1788-1791.
- Kumar, A., Kumar, A., Thakur, P., Patil, S., Payal, C., Kumar, A., Sharma, P. (2012). Antibacterial activity of green tea (*Camellia sinensis*) extracts against various bacteria isolated from environmental sources. *Recent Research in Science and Technology*, 4(1), 19-23.
- Ma, C., Gong, G., Liu, Z., Ma, A. & Chen, Z. (2015). Stimulatory effects of tea supplements on the propagation of *Lactobacillus casei* in milk. *International Dairy Journal*, 43, 1-6.
- Mandal, S., Mandal, M., Pal, N.K., Saha, K. (2011). Inhibitory and killing activities of black tea (*Camellia sinensis*) extract against *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype Ogawa isolates. *Jundishapur Journal Microbiology*, 4, 115-121.
- Marhamatizadeh, M.H., Rafatjoo, R., Farokhi, A.R., Karmand, M. & Rezaazade, S. (2009). The study of soya extract on the growth of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* bacteria in probiotic milk and yoghurt. *Journal of Veterinary Pathobiology*, 1, 23-28.
- Marhamatizadeh, M.H., Ehsandoost, E., Gholami, P. (2013). The influence of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract on characteristic of probiotic bacteria in milk and yoghurt during fermentation and refrigerated storage. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2(17), 599-606
- Michalczyk, M., Zawislak, A. (2008). The effect of tea infusions on the proliferation of selected bacteria important for the human intestinal tract. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 7(1), 59-65
- Najgebauer-Lejko, D. (2014). Effect of green tea supplementation on the microbiological, antioxidant, and sensory properties of probiotic milks. *Dairy Science and Technology*, 94, 327-339
- Najgebauer-Lejko, D., Sady, M., Grega, T., Walczycka, M. (2011). The impact of tea supplementation on microflora, pH and antioxidant capacity of yoghurt. *International Dairy Journal*, 21, 568-574
- Negi, P.S., Chauhan, A.S., Sadia, G.A., Rohinishree, Y.S., Ramteke, R.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 92, 119-124.
- O'Connell, J.E., Fox, P.F. (2001). Heat stability of milk and heat induced changes. In *Advanced Dairy Chemistry. I. Proteins*. 3rd ed. P. F. Fox and P.L.H. McSweeney, ed. Aspen Publications, Gaithersburg, MD, USA. ISBN 978-1-4419-8602-3
- Radji, M., Agustama, R.A., Elya, B., Tjampakasari, C.R. (2013). Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8), 663-667
- Shetty, M., Subbannaya, K., Shivananda, P.G. (1994). Antibacterial activity of tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea Arabica*) with special reference to *Salmonella typhimurium*. *Journal of Communication Disaster*, 26(3), 147-150.
- Witthuhn, R.C, Schoeman, T., Britz, T.J. (2005): Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15, 383-389.
- Wu, S.C., Yen, G.C., Wang, B.S., Chiu, C.K., Yen, W.I., Chang, L.W., Duh, P.D. (2007). Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3), 506-512.
- Wszolek, M., Tamime, A.Y., Muir, D.D., Barclay, M.N.I. (2005). Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine caprine and ovine milk with different starter cultures *LWT-Food Science and Technology*, 34, 251-261.
- Ye, J., Fan, F.X.X. & Liang, Y. (2013). Interactions of black and green tabletea polyphenols with whole milk. *Food Research International* 53, 449-455.



KURU ÜZÜMLERDE KÜF YÜKÜNÜN SAYI VE ÇEŞİTLİLİK OLARAK BELİRLENMESİ, DEPOLAMANIN ETKİSİ VE FLORADAKİ DOMİNANT KÜF TÜRLERİNİN SAPTANMASI

Fulya Turantaş¹ , Özgül Sömek² 

Cite this article as:

Turantaş, F., Sömek, Ö. (2018). Kuru Üzümlerde Küf Yükünün Sayı ve Çeşitlilik Olarak Belirlenmesi, Depolamanın Etkisi ve Floradaki Dominant Küf Türlerinin Saptanması. Food and Health, 4(2), 132-139. DOI: 10.3153/JFHS18013

¹ Ege Üniversitesi Ege Meslek Yüksekokulu Gıda Mikrobiyolojisi Bornova, İzmir

² Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ABD Bornova, İzmir

Submitted: 24.05.2017

Accepted: 21.09.2017

Published online: 11.02.2018

Correspondence:

Fulya TURANTAŞ

E-mail: fturantas@gmail.com

©Copyright 2018 by ScientificWebJournals

Available online at

www.scientificwebjournals.com

ÖZ

Bu çalışmada İzmir Manisa yöresi Salihli, Akhisar, Sarıgöl ve Alaşehir ilçelerinden temin edilen 66 adet kuru üzüm örneğinde Dichloran %18 Glycerol Agar (DG18), Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) ve Malt Extract Agar (MEA) olmak üzere üç farklı besiyerinde küf sayımları yapılmış ve bu üç besiyeri seçicilik (farklı küf cins-tür sayısı ve dağılımı) ve elde edilen farklı cins-türlerin kültürel özelliklerinin tanımlanması açısından karşılaştırılmıştır. Adı geçen üç farklı besiyerinde elde edilen küf sayıları arasında istatistiki düzeyde önemli bir farklılık olmadığı ($P>0.05$) saptanmış, DG18 besiyeri ise koloni belirginliği, izolasyon kolaylığı, tür-cins çeşit sayısının azlığı ve gerekse kolonilerin diğerlerinden kolaylıkla ayırt edilebilirliği açısından olumlu sonuçlar verdiği için küf sayımlarında kullanılmak üzere seçilmiştir. 66 farklı kuru üzüm örneğinin hiçbirinde mayaya rastlanmamıştır. Çalışma kapsamında ayrıca kuru üzüm florasında mevcut, farklı kültürel özelliklere sahip küf türlerinin çeşitliliği belirlenmiştir. Dominant küf türünün saptanması amacıyla analize alınan 26 kuru üzüm örneğindeki küf çeşitlerinin sayısı 2-3 adetle sınırlı kalmış ve dominant iki türün identifikasyon çalışmalarında her ikisinin de aynı tür olduğu (*Aspergillus niger* Tiegh) belirlenmiştir. Yapılan izolasyon ve identifikasyon çalışmaları sonucunda elde edilen *Aspergillus niger* Tiegh suşu Ege Bölgesinin İzmir ve Manisa yörelerinin kuru üzüm örneklerinden izole edilmesi nedeniyle *Aspergillus niger* Tiegh subsp. *kuru üzüm Ege* olarak adlandırılmıştır. Depolama analizleri yapılan 15 örneğin oda sıcaklığında 8 haftalık depolama sürecinde küf sayılarının ortalama 4 haftalık (4.33 ± 1.95) depolama süresi sonunda 10^4 cfu/g'ün altına indiği saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kuru üzüm, Küf sayısı, Depolama, *Aspergillus niger*

ABSTRACT

DETERMINATION OF MOULD COUNT, DIVERSITY, THE EFFECT OF STORAGE AND DOMINANT MOULD STRAINS IN RAISIN SAMPLES

Three different media which are Dichloran %18 Glycerol Agar (DG18), Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) and Malt Extract Agar (MEA) were used for mould count in 66 raisin samples obtained from İzmir and Salihli, Akhisar, Sarıgöl, Alaşehir which are district of Manisa region, and all results showed that three different media were not statistically different from each other ($P>0.05$). DG18 was accepted as counting media in this research because of selectivity, colony morphology and differentiate cultural characteristics. At the end of these analyses, none of the raisin samples were contain yeast cells so (<10 cfu/g), all microbial counts are presented as mould counts in the raisin samples. The aim of the present study was to determine the diversity, occurrence, and distribution of mould species and to determine the dominant mould strain in raisin samples. Additionally, the dominant mould strain was isolated from 26 raisin samples and it was called as *Aspergillus niger* Tiegh *kuru üzüm Ege*. In addition, it was determined that the mould count decreased to $<10^4$ cfu/g level at the end of the 4 weeks (average value of 8 weeks; 4.33 ± 1.95) storage period in raisin samples stored at room temperature.

Keywords: Raisin, Mould count, Storage, *Aspergillus niger*

Giriş

Kurutulmuş meyve ve sebzeler ülkemiz ihracatında önemli bir yere sahiptir. Türkiye’de üretilen kuru üzümün %20-28’i yurt içinde tüketilirken, geriye kalan %72-80’ini oluşturan 180-230 bin tonluk kısmı ihraç edilmektedir. Kuru meyve-sebze ihracatında yer alan ürün grupları arasında %33.68’lik pay ile en yüksek ihracat potansiyeline sahip ürün çekirdeksiz kuru üzüm olup, 2013-2014 yılı itibarıyla 488 milyon dolarlık dış ticaret hacmine sahiptir (Türkiye Gıda Dernekleri Federasyonu, 2014). Söz konusu pazar payı ile Türkiye dünya kuru üzüm ihracatında ilk sırada yer almaktadır.

Tarım ürünlerinin dış pazardaki payının korunması ihraç edilen ürünlerin kalitesi ile doğrudan ilişkilidir. Kuru üzümde en önemli kalite kriterleri boyut, renk, fungal yük ve buna bağlı olarak mikotoksin miktarıdır. Ülkemiz kuru üzüm ihracatında küf yükünün yurt dışı spesifikasyonlarının üzerinde olması nedeniyle zaman zaman problemler yaşanabilmekte, gerek ürünün gramındaki küf sayısı ve gerekse içerdiği mikotoksin nedeniyle belirli parti ürünlerin ihracatında sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Ege Kuru Meyve ve Mamülleri İhracatçıları Birliği, 2016; Şen, 2014). Söz konusu problemler ülkemizin dünya ticaretindeki lider konumunu tehlikeye düşürmekte ve ekonomik açıdan ciddi kayıplara neden olmaktadır. Yüksek küf yüküne sahip kuru üzümün iç piyasada ve pazarda satışı da halk sağlığı açısından sorun teşkil etmektedir.

Genel olarak taze meyve ve meyve ürünlerinin doğal mikroflorasını bakterilerden daha düşük pH değerlerinde gelişip çoğalabilmeleri nedeniyle mayalar ve küfler oluşturur. pH faktörüyle beraber küflerin mutlak aerobik özelliğe sahip olması meyve ve sebzelerde dominant florayı oluşturmasında önemli bir etken oluşturmaktadır. Küfler meyve ve sebzelere hasat sırasında kontamine olmakta ve yüzeyde berelenmiş ve hasar görmüş noktalardan iç kısımlara geçiş yapabilmektedir. Böylece küfler olgun meyvelerin hasatı ve taşınması sırasında zedelenen bölgelerde ortam sıcaklığının ve nemin uygun olması durumunda kısa süre içerisinde çoğalarak belirli düzeye ulaşabilmektedirler. Bu tip meyve ve sebzelerde yüzey mikroflorası büyük önem taşımakla beraber diğer tüm kontaminasyon kaynakları, depolama ve taşıma atmosferi ve koşulları da önem taşımaktadır. Genellikle meyvelerin yüzeyinde *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* ve *Fusarium* türleri gelişmektedir (Adams vd., 2016; Jay vd., 2005; Karapınar ve Aktuğ Gönül, 2015; Ünlütürk vd., 2015).

Naturel yöntemlerle küf yükünün 1-2 logaritmik ünitelik düzeyde düşürülebilmesi yurt dışı ihracat spesifikasyonlarına ulaşılması açısından yeterli olacaktır (Ege Kuru Meyve ve

Mamülleri İhracatçıları Birliği, 2016). Ancak bu çalışmanın yapılabilmesi için önce ülkemizde üretilen kuru üzüm örneklerindeki küf yükünün, küf çeşitliliğinin ve dominant küf türlerinin saptanması gerekliliği söz konusudur. Dolayısıyla bu konuda yapılan bir survey çalışması olarak bu araştırma ülke ihracatımızda ilk sıralarda yer alan kuru üzümde küf sorununa bir çözüm getirmek ve florada yer alan küflerin naturel yöntemlerle dekontaminasyonuna yönelik daha sonra yapılacak olan çalışmalarını ışık tutmak amacıyla planlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada materyal olarak Ege Bölgesi İzmir Manisa yöresi Salihli, Akhisar, Sarıgöl ve Alaşehir ilçelerinde üretilmiş kuru üzüm örnekleri kullanılmış ve örnekler Tarım Üzüm Tarım Satış Koop. Birliği ve Rapunzel Organik Tarım Ürünleri ve Gıda Tic. Ltd. Şti.’den temin edilmiştir. Her hafta farklı partilerden şans örnekleme ile alınan 5 kg’lık alan örnekleri laboratuvara getirildikten sonra analize alınmaya kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Küf ve Maya Sayımı

Küf ve maya sayımı amacıyla 10 g örnek aseptik şekilde tartılarak içerisinde 90 ml peptonlu su (% 0.1’lik peptone) bulunan stomacher torbası içine aktarılmış ve stomacherda (Seward 400) 60 s süre ile homojenize edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan 10^{-1} ’lik dilüsyondan diğer desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır. Her bir dilüsyondan çift paralelli olacak şekilde steril petri kaplarına bir mililitre aktarılarak üzerine daha önceden eritilmiş 45-50°C’lik su banyosunda bekletilen DRBC (Merck 1.00466) besiyerinden yaklaşık 15-20 mililitre dökülmüş ve standart karıştırma yöntemiyle karıştırılmıştır. Aynı dilüsyonlardan MEA (Merck 1.05398) ve DG18 (Merck 1.00465) besiyerlerine de dökme plaka yöntemiyle yukarıda anlatıldığı şekilde inokülasyon yapılmış ve standart karıştırma yöntemiyle karıştırılmıştır. İnoküle edilen petripler 25°C’de 3-5 gün inkübe edilmiş, inkübasyon süresi sonunda örneğin gramındaki küf ve maya sayısı hesaplanmıştır (Tournas vd., 2001).

Küf sayımı yapıldıktan sonra, aynı örnekler oksijen geçirgenliği 4500-6000cc/m².gün olan 250 gramlık polietilen torbada (low density polyethylene-LDPE) ağzı sıkıca kapatılarak (torba içindeki hava elle bastırılıp mümkün olduğu kadar boşaltılarak) normal atmosfer koşullarında, oda sıcaklığında depolanmıştır. Depolanan kuru üzüm örneklerinde her hafta küf sayımı yapılmış ve analizler örneklerdeki küf sayısı gramda 10^4 ’ün altına (mikrobiyolojik kriterler tebliğine göre kuru üzümde izin verilen maksimum değer) ininceye

kadar devam ettirilmiştir. Depolanan örneklerde de küf sayımı yukarıda anlatıldığı şekilde DRBC agarda dökme plaka yöntemi ile yapılmıştır.

Küf Çeşitliliğinin Belirlenmesi, Dominant Küf Türünün Saptanması ve İdentifikasyonu

Küf sayımının ardından DG18 besiyerinde 25°C'de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda sayılabilecek düzeyde (10-100) koloni içeren petrielerde gelişen küf kolonileri arasında farklı kültürel özelliklere sahip kolonilerin sayısı saptanarak, örneklerdeki küf çeşitliliği belirlenmiştir. Küf sayımı yapılan petrideki koloniler arasında dominant küf kolonilerinin kültürel özellikleri itibariyle seçimi yapılmış ve sayısı belirlenerek, o örnekteki toplam küf sayısı içindeki yüzdesi hesaplanmıştır. Dominant küf türünün identifikasyonu TÜBİTAK MAM küf tanımlama laboratuvarında makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonrası morfolojik karakterizasyonda tanımlama anahtarı kullanılarak yapılmıştır (Klich, 2002, Pitt ve Hocking, 2009; Samson vd., 2010). Yapılan identifikasyon çalışmaları sonucunda elde edilen *Aspergillus niger* Tiegh türü Ege Bölgesi İzmir ve Manisa yöresi Salihli, Akhisar, Sarıgöl ve Alaşehir ilçelerinin kuru üzüm örneklerinden izole edilen tür olması nedeniyle *Aspergillus niger* Tiegh subsp. *kuru üzüm Ege* olarak adlandırılmıştır.

İstatistiksel Analizler

Denemeler aynı partiden üç tekerrürlü gerçekleştirilmiş olup, proses koşulları arasındaki farklılıklar SPSS 20.0 paket programı kullanılarak çoklu kıyaslama testi -Duncan testi- ile %95 güven aralığında değerlendirilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Kuru Üzümlerde Küf Sayısı

Ön denemelerde de 40 örnek analiz edilmiş ve 66 adet örnek de dahil olmak üzere toplam olarak 106 adet örnekte yapılan analizler sonucunda kuru üzüm örneklerinin hiçbirinde mayaya rastlanmamıştır (<10 cfu/g). Kuru üzüm örneklerinde DG18, DRBC ve MEA olmak üzere üç farklı besiyerinde yapılan küf sayımlarından elde edilen sonuçlar ise Tablo 1'de verilmiştir

Elde edilen sonuçlara göre; aynı kuru üzüm örneklerine ait DG18, DRBC ve MEA besiyerlerinde elde edilen küf sayılarının ortalamaları sırasıyla 4.91 ±0.75, 4.97 ±0.80 ve 4.92 ±0.75 log₁₀ cfu/g olarak saptanmıştır. Tablo 1'de görüldüğü gibi 66 örnekte üç farklı besiyerinde çift paralelli yapılan sayım sonuçları arasında istatistikî açıdan önemli düzeyde bir farklılık saptanmamıştır (P>0.05). Aşkun ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada 129 kuru üzüm örneğinde DRBC ve

DG18 besiyerlerinde küf sayımı yapmışlar her iki besiyerinde elde edilen ortalama değerleri sırasıyla 5.32 ve 5.45 log₁₀ cfu/g olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar DRBC ve DG18 besiyerlerinde elde edilen küf sonuçları arasında çalışmamızda varılan sonuçlara benzer şekilde istatistikî açıdan fark olmadığını (P>0.05) saptamışlardır (Aşkun vd., 2007).

Tablo 1. Üç farklı besiyerinde analize alınan kuru üzüm örneklerinde küf sayıları (n:66)

Table 1. Mould counts in raisin samples analysed on three different media (n:66)

Besiyeri	Küf sayısı (log ₁₀ cfu/g)
Dichloran %18 Glycerol Agar	4.91 ±0.75 ^a
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar	4.97 ±0.80 ^a
Malt Extract Agar	4.92 ±0.75 ^a

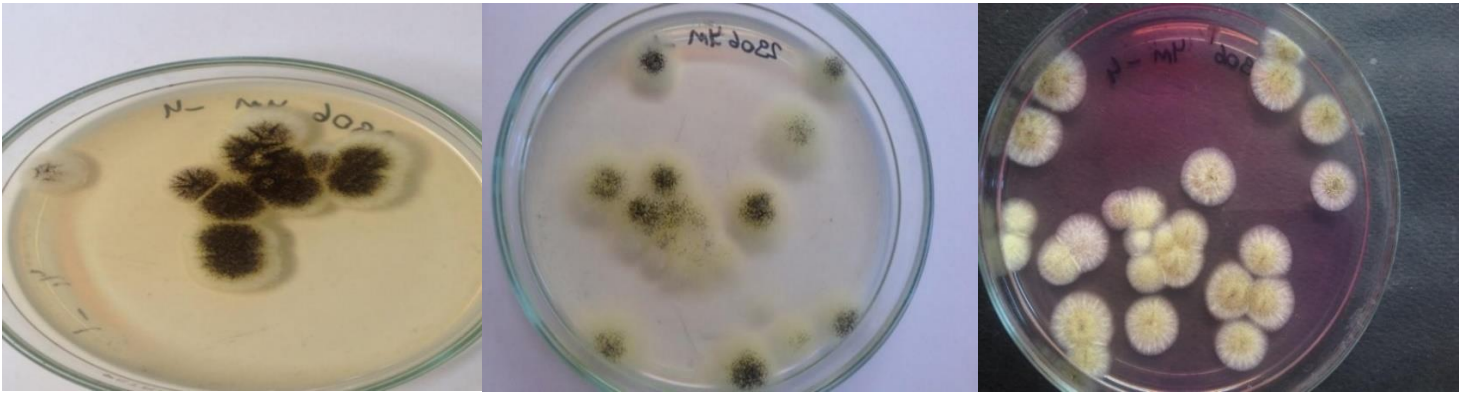
AlAskari vd. (2012) toplamda 210 örnekte yaptıkları bir araştırmada Fas'da yetiştirilen iki farklı üzüm çeşidi (siyah ve beyaz) ile birlikte; İran (küçük ve büyük boyutta), Türkiye, Çin ve Hindistan'dan ithal ettikleri kuru üzüm örneklerinde küf sayımı yapmışlardır. Fas siyah, Fas beyaz, İran büyük, İran küçük ve Türkiye olarak adlandırdıkları beş farklı kuru üzüm çeşidinde yaptıkları sayımlarda küf yükünün sırasıyla 4.87, 5.28, 3.56, 3.00 ve 4.76 log₁₀ cfu/g düzeyinde olduğu, buna ilaveten Çin ve Hindistan'dan ithal edilen kuru üzüm örneklerinde ise küf sayısının saptanabilir düzeyin altında olduğunu bildirilmişlerdir (<10 cfu/g). Şen ve Nas (2013) ise yaptıkları çalışmada yirmi farklı bölgeden temin ettikleri kuru üzüm örneklerinde küf sayısını saptamak için DRBC besiyerine ekim yapmışlar ve farklı bölgelerden temin edilen kuru üzüm örneklerindeki küf sayılarının maksimum, minimum ve ortalama değerlerinin sırasıyla 6.05, 3.57 ve 4.3 log₁₀ cfu/g düzeyinde olduğunu saptamışlardır. Sharma vd. (2008) ise toplam 20 adet örnekle yaptıkları çalışmalarında paketlenmemiş 10 adet kuru üzüm örneğinde küf sayısının 2.0- 6.60 log₁₀ cfu/g düzeyleri arasında değiştiğini saptamışlardır. Analize aldıkları paketlenmiş diğer 10 adet kuru üzüm örneğinin ise % 40'ında küf sayısının saptanabilir düzeyin (<10 cfu/g) altında olduğunu, örneklerin %60'ında ise 6.00 log₁₀ cfu/g düzeylerine kadar değişen oranlarda küf bulunduğunu belirlemişlerdir.

Dünya'da kuru üzüm üreticisi ülkelerin sınırlı sayıda olması bu konuda yapılan çalışmaları da kısıtlayan en önemli faktörlerden biridir. Bugüne kadar Çin, Fas, İran ve Türkiye'de kuru üzümle ilgili yapılan araştırmalarda görüldüğü kadarıyla bu ülkelerde üretilen kuru üzüm örneklerinde küf sayılarının Çin ve İran üzümleri hariç ortalama 4.30-5.45 log₁₀

cfu/g aralığında değiştiği ve kuru üzümde bu düzeylerdeki küf yükünün genelde ülkemiz ihracatında spesifikasyonları aşan değerler olduğu saptanmıştır. Buna ilaveten son dönemde kuru üzüm ihracatında diğer bir kalite kriteri olarak her bir parti kuru üzümün %5'inde okratoksin analizi zorunluluğunun gündeme gelmesi dikkate alınacak olursa bu durumun daha da önem kazanacağı açıktır. Okratoksinler genellikle *Aspergillus* türleri tarafından üretilen sekonder küf toksinleri olmakla beraber *Penicillium* türlerinin de bu toksini ürettiği bildirilmiştir (Jay vd., 2005; Karapınar ve Aktuğ Gönül, 2015; Keller vd, 2009; Trucksess ve Scott, 2008). Dolayısıyla kuru üzümde küf dekontaminasyonunun gerek yıkama aşamasında ve gerekse diğer aşamalarda bazı naturel yöntemlerle sağlanması ve küf sayısının 1-2 logaritmik ünite olmak üzere belirli düzeyde düşürülerek satışa sunulması gerek kuru üzümde ülkemizde yaşanan önemli düzeydeki ihracat kaybının önlenmesi ve gerekse insan sağlığı açısından bir zorunluluk arz etmektedir.

Kuru Üzüm Örneklerindeki Küf Çeşitliliğinin Belirlenmesi ve Dominant Küf Türünün Saptanması

Örneklerdeki küf sayımında DG18 besiyerinde gelişen kolonilerin makroskopik incelemeleri yapılmış, farklı kültürel özelliklere sahip küf kolonilerinin sayısı saptanarak, her bir örnekteki küf cins-tür sayısı belirlenmiştir (Tablo 2). Ayrıca, bu araştırmada DG18, DRBC ve MEA gibi üç farklı besiyerinde yapılan çalışmalar sonucunda DG18 besiyerinin 25°C'de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda diğer iki besiyerine kıyasla gerek koloni belirginliği, izolasyon kolaylığı, cins-tür sayısının azlığı (diğer cins-türlerin nispeten inhibisyonu) ve gerekse kolonilerin diğerlerinden kolaylıkla ayırt edilebilir olması açısından daha olumlu sonuçlar verdiği saptanmıştır (Şekil 1). DRBC besiyerinde ise genelde DG18 besiyerine kıyasla daha fazla sayıda (birkaç adet) farklı küf cins-türüne rastlandığı, buna karşın DRBC besiyerinde elde edilen küf sayılarının DG18 ve MEA'da elde edilen küf sayılarından istatistiki açıdan farklı olmadığı ($P>0.05$) saptanmış, dolayısıyla bu üç besiyerinden herhangi birinin kuru üzümde küf sayımında kullanılmasının mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır.



Dichloran %18 Glycerol Agar

Malt Extract Agar

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar

Şekil 1. Aynı kuru üzüm örneğinde DG18, MEA ve DRBC besiyerlerinde 25°C de 3 günlük inkübasyon süresi sonunda gelişen küf kolonileri

Figure 1. Mould colonies on agar media (DG18, MEA and DRBC) at the end of the 3 days incubation time at 25 °C (analyses were carried out in same raisin sample)

Tablo 2. Kuru üzüm örneklerinin DG18 besiyerinde 25°C de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda toplam küf sayısı, tür çeşitliliği sayısı, toplam küf florası içinde yer alan dominant küf türünün sayısı ve yüzdesi (n:26)**Table 2.** Species variety, number and percentage of dominant mould count and total mould count in raisin samples at the end of the incubation time at 25 °C in DG18 media (n:26)

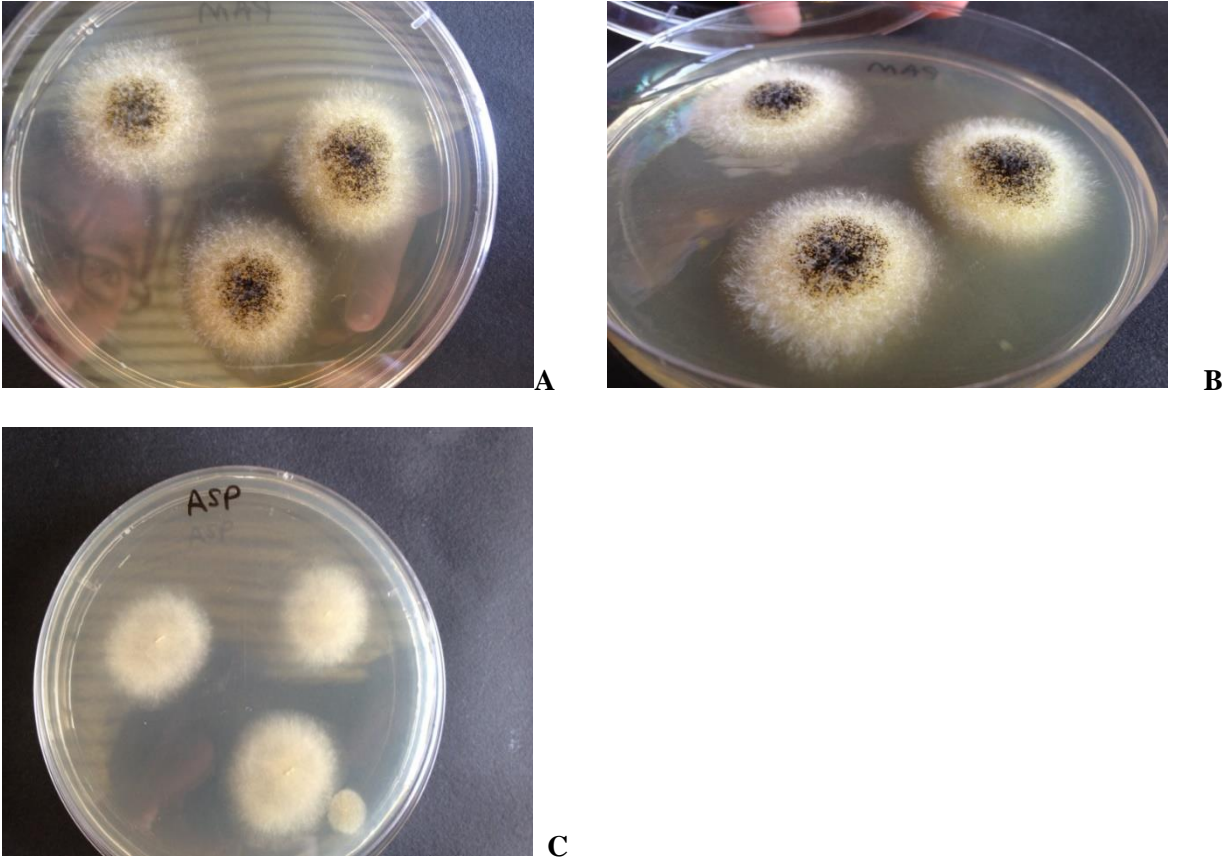
ÖRNEK KODU	KÜF SAYISI (log ₁₀ cfu/g)	KÜF CİNS-TÜR SAYISI (TÜR ÇEŞİTLİLİĞİ-adet) ¹	DOMİNANT KÜF TÜRÜNÜN ²	
			Sayısı (log ₁₀ cfu/g)	Yüzdesi (%)
1	4.50	2	4.32	66.1
2	4.72	3	4.65	85.0
3	4.68	3	4.49	63.9
4	4.56	3	4.34	62.5
5	4.32	2	4.11	60.5
6	4.77	3	4.61	69.7
7	5.41	2	4.28	55.8
8	4.94	3	4.66	52.2
9	4.80	2	4.69	76.0
10	4.38	1	4.38	100
11	4.54	2	4.48	85.9
12	4.34	2	4.20	75.0
13	4.39	2	4.28	76.0
14	4.47	2	4.30	67.2
15	4.51	2	4.32	63.6
16	4.62	2	4.52	78.8
17	4.20	2	3.95	59.4
18	4.91	3	4.69	59.4
19	4.50	2	4.40	79.7
20	4.77	2	4.71	86.4
21	4.45	2	4.34	80.4
22	4.28	2	4.15	71.8
23	4.85	3	4.60	57.9
24	4.40	2	4.18	63.3
25	4.32	2	4.11	62.8
26	4.40	3	4.18	62.0

¹ Her bir örnekteki farklı cins-türlerin (tanımlanmamış olduğu için bu şekilde ifade edilmiştir) sayısı 25 °C de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda belirlenmiştir.

² Dominant küfün (*Aspergillus niger* Tiegh subsp. *kuru üzüm Ege*) 1-2 mm yükseklikte siyah spor başlığı oluşturduğu ve petrinin arkasından bakıldığında ise beyaz renkte görüldüğü saptanmıştır.

Dominant küf türünün saptanması amacıyla analize alınan 26 kuru üzüm örneğindeki küf çeşitlerinin sayısı 2-3 adetle sınırlı kaldığı görülmüş, dominant iki türün identifikasyon çalışmalarında her ikisinin de aynı tür olduğu (*Aspergillus niger* Tiegh) ve dominant küf türüne ait kolonilerin o örnekteki farklı küf türlerinin toplamı içindeki yüzde ortalaması 70.05±11.53 olarak hesaplanmıştır. Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen *Aspergillus niger* Tiegh türü Ege Bölgesi İzmir ve Manisa Yöresinin kuru üzüm örneklerinden izole edilen bir tür olması nedeniyle *Aspergillus ni-*

ger Tiegh subsp. *kuru üzüm Ege* olarak adlandırılmıştır. Şekil 2'de TÜBİTAK MAM küf tanımlama laboratuvarında identifikasyonu yapılan *Aspergillus niger* Tiegh subsp. *kuru üzüm Ege* suşunun DG18 besiyerinde 25°C'de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda oluşan küf kolonileri görülmektedir. DG18 besiyerinde elde edilen dominant *Aspergillus niger* Tiegh subsp. *kuru üzüm Ege* suşuna ait siyah spor başlıklı koloniler (Şekil 2-A) dışında genelde farklı bir cins-türe ait koloni gözlenmemiş ve yapılan kültürel incelemeler sonunda *Aspergillus niger* Tiegh subsp. *kuru üzüm Ege* suşunun DG18 besiyerinde arkadan beyaz koloni görüntüsü verdiği saptanmıştır (Şekil 2-C).



Şekil 2. DG18 besiyerinde 25°C'de 5 günlük inkübasyon süresi sonunda gelişen dominant küf kolonisinin üstten (A), yandan (B) ve arkadan (C) görünüşü

Figure 2. Dominant mould colony views from top (A), side (B) and back (C) in DG18 media at the end of the 5 days incubation period at 25°C

Depolama süresince küf sayısındaki değişimler

Depolama süreci boyunca kuru üzüm örneklerindeki küf yükü değişimlerinin saptanması amacıyla yapılan haftalık küf sayımları örneklerdeki küf sayısı 10^4 cfu/g'ün altına (mikrobiyolojik kriterler tebliğine göre kuru üzümde maksimum değer) ininceye kadar sürdürülmüştür (Tablo 3). Depolama analizine alınan 15 kuru üzüm örneğinden elde edilen sonuçlara göre örneklerin ağzı kapalı oksijen geçirgen-

liği 4500-6000cc/m².gün polietilen (low density polyethylene-LDPE) naylon torbada, oda sıcaklığında depolanması durumunda küf sayılarının örneklerin %6'sında 8 haftada, %6'sında 7 haftada, %20'sinde 6 haftada, %13'ünde 5 haftada, %26'sında 3 haftada ve %20'sinde de 2 haftada gramda 10^4 'ün altına indiği görülmektedir. Sonuç olarak kuru üzüm örneklerindeki küf sayılarının ortalama $4 (4.33 \pm 1.95)$ haftalık süreçte 10^4 cfu/g'ün altına indiği saptanmıştır.

Tablo 3. Kuru üzüm örneklerinin oda sıcaklığında depolama süresi boyunca küf sayısındaki değişimler (\log_{10} cfu/g)**Table 3.** Mould counts of raisin samples during the storage period at room temperature (\log_{10} cfu/g)

Örnek kodu	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta	7. hafta	8. hafta
1	5,15	4,51	3,95	4,41	4,40	4,40	4,53	3,85
2	4,91	5,59	4,90	5,00	5,28	4,96	3,32	
3	5,89	4,20	4,20	4,20	4,41	3,53		
4	6,46	6,10	5,90	5,59	4,40	3,30		
5	5,46	5,20	4,86	4,49	5,00	3,72		
6	4,48	4,99	4,15	3,72	3,52			
7	5,43	5,68	5,00	4,14	3,52			
8	4,20	4,54	4,77	3,53				
9	4,23	4,00	3,45					
10	4,08	4,23	3,54					
11	4,95	4,75	3,57					
12	4,71	4,30	3,91					
13	5,04	3,52						
14	4,49	3,73						
15	4,08	3,56						

Sonuç

2, 3 ve 6 haftalık depolama süreçleri sonucunda analize alınan kuru üzüm örneklerindeki küf sayılarında sırasıyla ortalama 0,93, 0,87 ve 2,42 logaritmik ünitelik sayısal azalmalar olduğu görülmektedir. Değişik üreticilerden toplanan örneklerde 10^4 ve 10^5 cfu/g düzeylerindeki başlangıç küf yükü genelde stabil olup, bu düzeylerde seyretmekle birlikte, depolama sürecinde ortaya çıkabilecek 1-2 logaritmik düzeydeki sayısal azalmaların ortalama 4 haftalık süreçte kuru üzüm örneklerinin gramındaki küf sayısının 10^4 'ün altına inmesini sağlayabildiği söylenebilir.

Teşekkür

Araştırmada küf izolasyon ve kültürel çalışmalarını yürüten teknik eleman Semra Özışıklar'a teşekkürlerimizi sunarız. Bu çalışma TÜBİTAK 214O635 nolu projenin survey kısmından oluşmaktadır.

Kaynaklar

Adams, M.R., Moss, M.O. & McClure, P. (2016). *Food Microbiology* (4th edition). UK: The Royal Society of Chemistry, p.6-21, ISBN 978-1-84973-960-3

AlAskari, G., Kahouadji, A., Khedid, K., Charof, R. & Menane, Z. (2012). Physicochemical and Microbiological Study of "Raisin", Local and Imported (Morocco). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11(1), 1-6.

Aşkun, T., Eltem, R., Özkale, E. (2007). Comparison of Rose-Bengal Chloramphenicol Agar and Dichloran Glycerol Agar (DG18) for Enumeration and Isolation of Moulds from Raisins. *Journal of Applied Biological Sciences*, 1(2),71-75.

Ege Kuru Meyve ve Mamülleri İhracatçılar Birliği, (2016). 2015-2016 Sezonu çalışma raporu ve faaliyet planı. Retrieved from <http://upload.eib.org.tr/20150512/0000000001309.pdf> (accessed 04.05.2017).

Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005) Habitats, Taxonomy and Growth Parameters. In *Modern Food Microbiology*. USA, Springer.

- Karapınar, M., Aktuğ Gönül, Ş. (2015). Gıda Kaynaklı Mikrobiyal Hastalıklar. In A.Ünlütürk & F.Turantaş (Eds.), *Gıda Mikrobiyolojisi* (pp. 107-162). İzmir: Meta Basım Matbaacılık.
- Keller, Th., Nonn, H., Jeroch, H. (2009) The effect of sealing and of additives on the fermentation characteristics and mould and yeast counts in stretch film wrapped big-bale lucerne silage. *Archives of Animal Nutrition*, 51(1), 63-75.
- Klich, M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. ISBN 90-70-351-46-3
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage. New York: Springer Science and Business Media. ISBN 9780387922065
- Samson, R.A., Houbaken, J., Thrane, U., Frisvad, J.C. & Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
- Sharma, S., Chandra, P., Mishra, C. & Kakkar, P. (2008). Microbiological Quality and Organochlorine Pesticide Residue in Commercially Available Ready-To-Eat Raisins. *Bull Environ Contam Toxicol* 81, 387-392.
- Şen, L. (2014). Kuru üzümde okratoksin a oluşumu ve depolama koşullarının okratoksin a düzeyine etkisi. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi.
- Şen, L. & Nas, S. (2013). Identification of ochratoxigenic fungi and contextual change on dried raisins (Sultanas). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(3&4), 155-161.
- Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.V., Koch, H.A., Bandler, R. (2001). Bacteriological Analytical Manual Online. US Food and Drug Administration <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-18.html> (accessed 04.05.2017)
- Trucksess, M.W., Scott, P.M. (2008). Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(2),181-192.
- Türkiye Gıda Dernekleri Federasyonu. (2014, Mart). T.C. Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi / Kuru Üzüm. <http://www.tgdf.org.tr/turkce/tgdfraporlari/igmku-ruuzum.pdf> (Erişim tarihi 19.03.2014).
- Ünlütürk, A., Karapınar, M. & Turantaş, F. (2015). Gıdalarda Önemli Mikroorganizmalar. In A.Ünlütürk & F.Turantaş (Eds.), *Gıda Mikrobiyolojisi* (pp. 11-45). İzmir: Meta Basım Matbaacılık. ISBN 9789754833836



CHİA TOHUMU KULLANILARAK ZENGİNLEŞTİRİLEN GALETALARIN BAZI KİMYASAL VE FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ

Ezgi Özgören¹ , Hatice Betül Kaplan¹ , Senem Tüfekçi² 

Cite this article as:

Özgören, E., Kaplan, H.B., Tüfekçi, S. (2018). Chia Tohumu Kullanılarak Zenginleştirilen Galetaların Bazı Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri. Food and Health, 4(2), 140-146. DOI: 10.3153/FH18014

¹ Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli, Türkiye

² Pamukkale Üniversitesi, Acıpayam Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Denizli, Türkiye

Submitted: 30.09.2017

Accepted: 01.01.2018

Published online: 16.02.2018

Correspondence:

Senem TÜFEKÇİ

E-mail: stufekci@pau.edu.tr

©Copyright 2018 by ScientificWebJournals

Available online at

www.scientificwebjournals.com

ÖZ

Bu çalışmada farklı oranlarda chia tohumu kullanılarak üretilen galetaların bazı kimyasal ve fiziksel özelliklerinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Galeta örnekleri chia tohumu ilave edilmeyen (kontrol), %5 ve %10 oranında chia tohumu ilave edilen örnekler olmak üzere üç şekilde üretilmiştir. Chia ilaveli ve ilavesiz galeta örneklerinde genel kimyasal kompozisyon, antioksidan aktivite, toplam fenolik madde miktarı, renk, ağırlık kaybı ve duyu analizler yapılmıştır. Chia tohumu ilavesi ile örneklerin kül, yağ ve protein içeriklerinin arttığı gözlemlenmiştir. pH değerlerinin de chia tohumu ilavesi ile birlikte istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$). Pişirme süresince gerçekleşen toplam ağırlık kaybı chia tohumu ilaveli ve ilavesiz örnekler arasında farklılık göstermemektedir ($p > 0.05$). Chia tohumu ilaveli galeta hamuru örneklerinde a ve b değerleri kontrol örneklerine göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gösterirken, pişmiş galetalarda anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. %10 chia tohumu ilave edilen örnekte kontrol örneğinin 2.20 katı antioksidan aktivite belirlenmiştir. Zenginleştirilmiş örneklerde toplam fenolik madde miktarının istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Örneklerin duyu analizinde en yüksek puanı %10 chia tohumu ilaveli galeta örneği almıştır. Sonuç olarak, chia tohumu ilavesinin galeta örneklerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca duyu analiz sonuçlarına göre chia ilavesinin örneklerin kabul edilebilirliğini arttırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Chia tohumu, Galeta, Zenginleştirme, Fonksiyonel gıdalar

ABSTRACT

SOME CHEMICAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF BREADSTICKS PRODUCED BY USING CHIA SEED

In this study, changes in some chemical and physical properties of breadsticks produced by using chia seed at different ratios were investigated. Breadstick samples were produced in three forms as; non-supplemented (control), chia seed supplemented at 5% and 10% ratios. General chemical composition, antioxidant activity, total phenolic content, color, weight loss and sensory analysis were performed in chia seed supplemented and non-supplemented breadstick samples. It was observed that ash, fat and protein content of samples were increased with chia seed addition. It was also determined that the pH values were significantly increased with the addition of chia seed ($p < 0.05$). Weight loss during baking shows no difference between chia seed supplemented and non-supplemented samples ($p > 0.05$). The values of a and b of chia seed supplemented breadstick dough samples were statistically decreased compared to control samples while a significant difference was not found between baked samples. Total antioxidant activity was determined 2.20 times of control sample for 10% chia seed supplemented breadstick sample. It was determined that total phenolic content of enriched samples was increased statistically significant ($p < 0.05$). The highest score in the sensory evaluation of breadstick samples was obtained by 10% chia seed supplemented sample. In conclusion, it was determined that the addition of chia seed has positive effect on chemical and physical properties of breadstick samples. In addition, it was found that acceptability of samples were increased with chia seed supplementation according to the results of sensory evaluation.

Keywords: Chia seed, Breadstick, Enrichment, Functional foods

Giriş

Birçok ülkede yaygın olarak tüketilen gıdaların başında fırıncılık ürünleri gelmektedir. Bu ürünlerden bisküvi, kraker ve galeta uzun raf ömrüne sahip olması açısından önem taşımaktadır (Calligaris ve ark., 2008). Galeta, İtalya'nın kuzeybatısında 1600'lü yıllardan beri üretilen geleneksel bir ürün olup, İtalyan mutfağının önemli sembollerinden biridir. Uzun ince çubuk şeklinde olan galeta gevrek yapıya sahip bir fırıncılık ürünüdür (Zeppa ve ark., 2007). Sağlıklı gıda ürünlerine olan talebin giderek artmasına bağlı olarak başta ekmek olmak üzere, fırıncılık ürünlerinin alternatif doğal gıda kaynaklarıyla zenginleştirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır (Coelho ve ark., 2015).

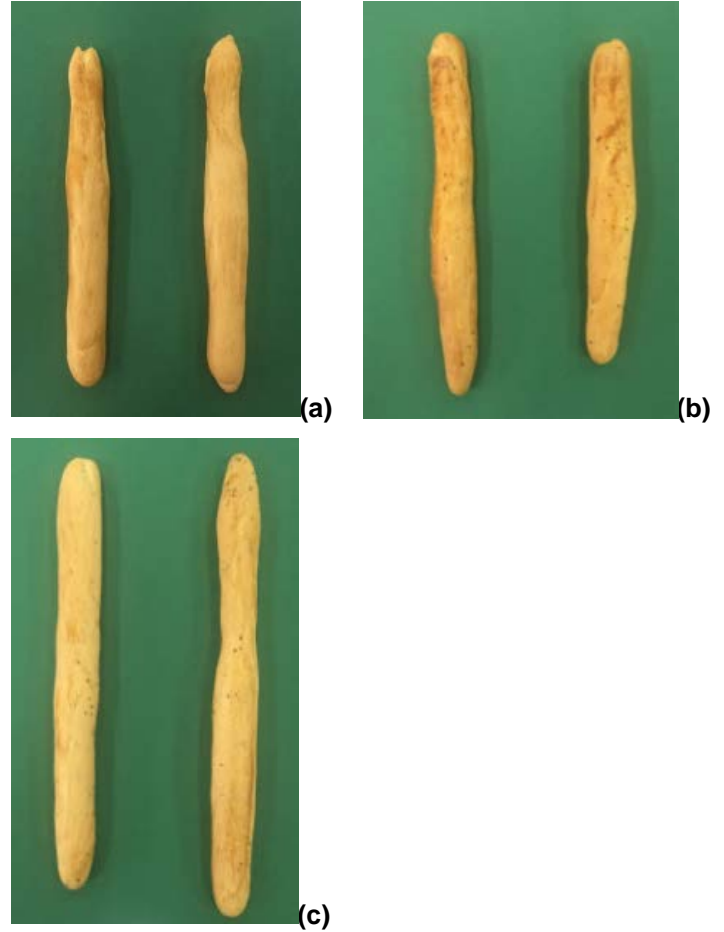
Bu gıda kaynaklarından biri olan Chia (*Salvia hispanica* L.), anavatanı Meksika'nın güneyi ve Guetamala'nın kuzeyi olan Lamiaceae ailesine ait yıllık otsu bir bitkidir (Bodoira ve ark., 2017). Tarihsel kayıtlar, chia tohumunun Maya ve Aztek uygarlıklarının ve kolomb öncesi dönemde Orta Amerika'nın temel gıdalarından biri olduğunu belirtmektedir (Chicco ve ark., 2009; Peiretti ve Gai, 2009; Verdu ve ark., 2017). Çeşit ve yetişme koşullarına bağlı olarak chia tohumunun kimyasal bileşimi, %15-20 arasında protein, %30-33 arasında yağ, %4-5 arasında kül, %26-41 arasında karbonhidrat ve %18-30 arasında lifden oluşmaktadır (Coelho ve ark., 2015; Zettel ve ark., 2016). İyi bir linoleik ve linolenik asit kaynağı olarak kabul edilen chia tohumu, genel olarak düşük oranda doymuş yağ asitlerini ve yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitlerini içermektedir (Ixtaina ve ark., 2008; Mello ve ark., 2017). Chia tohumunun diğer bir özelliği ise %6'sını çözünen liflerin oluşturduğu yüksek diyet lifi oranına sahip olmasıdır (Goh ve ark., 2016). Fırıncılık ürünlerinde diyet lifi ilavesi ile su tutma kapasitesi artırılarak tazeliği korumak mümkün olsa da, aşırı diyet lifi ilavesi son üründe olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Zettel ve ark., 2016). Chia tohumu müsilajı ise, yüksek oranda üronik asit içeren, yüksek su emme ve tutma kapasitesine sahip bir tetrasakkarittir ve hidrokolloid gibi davranarak son ürün özelliklerini olumlu etkilemektedir (Zettel ve ark., 2016; Verdu ve ark., 2017). Bu özelliklerinin yanında chia tohumunun doyunluk hissini arttırdığı; kalp-damar, diyabet, dislipidemi gibi hastalıkların riskini azalttığı; ağrı kesici, antidepresan, laktasif etkilerinin olduğu ve bağışıklığı arttırdığı bildirilmiştir (Coelho ve ark., 2015; Levent 2017).

Bu çalışmada farklı oranlarda chia tohumu ilavesi ile üretilen galetaların kimyasal ve fiziksel bazı özellikleri araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Galeta üretiminde kullanılacak olan chia tohumları ticari ölçekte üretim gerçekleştiren bir firmadan temin edilmiştir. Chia tohumlarına herhangi bir ön işlem uygulanmamıştır. Galeta örneklerinin üretiminde kullanılan bileşenler Tablo 1.'de gösterilmiştir.

Tabloya göre hazırlanan hamurlar 3 dakika yoğurulmuştur. Yoğurma işleminden sonra şekil verilen hamurlar 180°C'deki fırında 15 dakika pişirilerek galeta üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen galetalar Şekil 1' de gösterilmiştir.



Şekil 1. (a) Chia tohumu ilave edilmeyen (kontrol) örnek
(b) %5 chia tohumu ilaveli örnek
(c) %10 chia tohumu ilaveli örnek

Figure 1. (a) Sample prepared without chia seed (Control)
(b) 5% chia seed added sample
(c) 10% chia seed added sample

Genel Kimyasal Kompozisyon Analizleri

Nem tayini ve kül tayini AOAC (1990)'a göre gerçekleştirilmiştir. Yağ tayini Soxhlet metodu kullanılarak (AOAC, 1997), protein tayini Kjeldahl metodu kullanılarak (AACC 2012) tespit edilmiştir. pH tayini örnekler 1:10 oranında sulandırılarak dijital pH-metre (Crison Instruments, Basic 20+) kullanılarak tespit edilmiştir.

Duyusal Analiz

Duyusal analiz 12 panelist tarafından yapılmıştır. Örnekler rastgele üç basamaklı rakamlarla kodlanmış ve rastgele bir düzende servis edilmiştir. Panelistlerden örneklerin renk, koku, kırılgenlik, lezzet ve genel beğeni özelliklerini 1-7 puan aralığında (1 çok kötü, 7 çok iyi) hedonik skala kullanarak değerlendirmeleri istenmiştir (Altuğ Onoğur ve Elmacı, 2011).

Renk Analizi

Örneklerin dış renk değerleri üç farklı noktadan Hunter-Lab Mini Scan XE cihazı (Hunter Associates Laboratory, Reston, VA) ile ölçüm yapılarak tespit edilmiştir. Her ölçüm öncesi cihaz beyaz ve siyah plakalarla kalibre edilmiştir. Ölçümler Hunter Lab Renk skalasına göre yapılmış ve L (Parlaklık; siyah=0 beyaz=100), a (-yeşil, +kırmızı), b (-mavi, +sarı) değerleri belirlenmiştir.

Ağırlık Kaybı (Fire)

Örneklerin pişirme işlemi sırasında ağırlık kaybı (fire) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır (Turabi ve ark., 2016).

$$\text{Fire} = [(\text{Hamur ağırlığı (g)} - \text{pişmiş galeta ağırlığı (g)}) / \text{pişmiş galeta ağırlığı (g)}] * 100$$

Antioksidan Aktivite

Antioksidan aktiviteleri DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) yöntemiyle trolox eşdeğeri olarak belirlenmiştir (Thaipong ve ark., 2006)

Toplam Fenolik Madde Miktarı

Toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu yöntemiyle gallik asit eşdeğeri olarak belirlenmiştir (Thaipong ve ark., 2006)

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 16.0 paket programı (SPSS Inc. Chicago, Illinois) kullanılarak yapılmıştır. Örnekler arasındaki ortalama değerler Duncan çoklu karşılaştırma modeli kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Genel Kimyasal Bileşim ve pH Değerlerinin Belirlenmesi

Chia tohumu ilaveli ve ilavesiz (kontrol) galetaların yağ, protein, kül, pH ve ağırlık kaybı değerleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Chia tohumu ilavesi ile örneklerin kül, yağ, protein ve pH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüştür ($p < 0.05$).

Meydana gelen bu artışın; literatürdeki çalışmalarda da raporlandığı üzere chia tohumunun yüksek yağ, protein, diyet lifi ve mineral içeriğine bağlı olduğunu göstermektedir (Capitani ve ark, 2012; Ixatania ve ark, 2008). Ayrıca chia tohumu ve chia tohumu unu ilavesi ile ekmek ve kek üretiminin gerçekleştiği çalışmalarda da benzer şekilde yağ, protein ve kül oranında artışlar gerçekleşmiştir (Coelho ve ark, 2015; Igleas-Puig ve Horos 2013, Pizarro ve ark, 2013). Pizarro ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışmada standart kek ve chia unu ilaveli kek üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu örnekler karşılaştırıldığında standart kek örneğinin protein, yağ ve kül değerleri sırasıyla %7.98, %12.44, %1.18 olarak tespit edilirken, chia unu ilaveli örneğin aynı özelliklere ait değerleri sırasıyla %8.55, %16.28 ve %1.40 olarak belirlenmiştir. Protein, yağ ve kül değerlerinin chia unu ilavesiyle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür ($p < 0.05$).

Tablo 1. Galeta örneklerinin bileşimi

Table 1. Composition of breadstick samples

CİO (%)	Un (g)	Chia (g)	Şeker (g)	Tuz (g)	Maya (g)	Katıyağ (g)	Su (ml)
0	100	0	4	1.5	2.5	20	40
5	95	5	4	1.5	2.5	20	40
10	90	10	4	1.5	2.5	20	40

CİO: Chia ilave oranı

%10 chia tohumu ilaveli galeta ile kontrol örneklerinin pH değerlerinde anlamlı bir farklılık meydana geldiği tespit edilmiştir. Mesias ve ark., (2016) chia ilaveli bisküvi üretimi üzerine yaptıkları çalışmalarında buğday ununun pH değeri (6.5) ile chia tohumu ununun pH değerinin (6.7) oldukça yakın olduğunu bildirmişlerdir, bu durumda %5 chia tohumu ilavesiyle pH değerinde kayda değer bir değişim görülmemesi literatürdeki bilgilerle uyum göstermektedir.

Ağırlık Kaybı

Pişirme süresince gerçekleşen toplam ağırlık kaybı chia tohumu ilaveli ve ilavesiz örnekler arasında farklılık göstermezken ($p>0.05$) (Tablo 2), chia tohumu ilave oranı arttıkça ağırlık kaybında nispeten de olsa artış olduğu görülmüştür. Glutensiz ekmek kalitesi üzerine chia tohumu ve ununun etkisinin incelendiği bir çalışmada, chia tohumlu ekmekler içinde suda bekletilmemiş chia tohumu ilaveli ekmeklerde kontrol örneklerinden sonra en yüksek su kaybının gerçekleştiği raporlanmıştır (Steffolani ve ark., 2014). Bu durumda, galeta üretimi öncesinde chia tohumunu suda bekletme veya un formunda kullanılması ağırlık kaybını azaltabilecektir ve bu sayede pozitif bir ekonomik katkı sağlanabilecektir.

Renk Değişimi

Her bir galeta hamurunda ve pişmiş örneklerde dış renk değerleri belirlenmiştir (Tablo 3). Analiz sonuçlarına göre hamurların ve pişmiş galetaların L değerinde chia ilavesi ile istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin meydana gelmediği belirlenmiştir. Bunun yanında chia tohumu ilaveli galeta hamurlarında a ve b değerleri kontrol örneklerine göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gösterirken, pişmiş galetalarda anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p<0.05$). Yapılan bir çalışmada Steffolani ve ark., (2014) chia tohumu ve chia unu ilave ederek (15g chia tohumu veya unu/100g pirinç unu) glutensiz ekmek üretimi gerçekleştirmişlerdir. Örneklerin dış renk değerleri ölçüldüğünde L* değerinde chia tohumu ilavesi ile artış meydana gelirken chia unu ilavesi ile azalma meydana geldiği görülmüştür. Hem chia tohumu hem de chia unu ilavesi ile örneklerin a* ve b* değerlerinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir. a* ve b* değerlerindeki değişimin bu çalışma ile paralel olduğu görülmüştür.

Diğer bir çalışmada %10 chia ilavesi ile üretilen ekmeklerin dış renklerinde L*, a*, b* değerlerinde azalma meydana geldiği görülmüştür. Bununla birlikte L* ve a* değerlerinde istatistiksel açıdan fark görülmezken, b* değerinde anlamlı bir farklılık meydana geldiği belirlenmiştir ($p<0.05$) (Costantini ve ark., 2014). Çalışma sonuçlarının bu çalışma ile paralel olduğu tespit edilmiştir.

Antioksidan Aktivite ve Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Antioksidan Aktivite ve Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Chia tohumu ilaveli galetaların antioksidan aktivite değerleri ve toplam fenolik madde miktarlarının kontrol örneğine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 4). %10 chia tohumu ilavesi ile kontrol örneğinin 2.20 katı kadar antioksidan aktiviteye ulaşılmıştır. Bu konuda yapılan birçok çalışma mevcuttur. Coorey ve ark. (2012)'nin yaptıkları bir çalışmada formülasyona %5-10-12-15 oranlarında chia unu ilavesi ile cips üretimi gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite analizi sonucunda chia unu ilavesi arttıkça örnekler arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir. Yapılan diğer bir çalışmada %10 chia unu ilavesi ile üretilmiş ekmeklerde antioksidan aktivite değerleri FRAP ve ORAC yöntemleriyle tayin edilmiştir. Chia unu ilavesiyle antioksidan aktivitede artış meydana geldiği görülmüştür. Kontrol örneğiyle kıyaslandığında chia unu ilaveli örneğin FRAP yöntemine göre 3.3 kat, ORAC yöntemine göre 2.8 kat daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı ise kontrol örneğinde 3.3 mg GAE/g olarak belirlenirken, %10 chia unu ilaveli ekmeklerde 4.5 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir (Costantini ve ark., 2014). Çalışmaların bu çalışma ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Tablo 2. Chia tohumu ilaveli ve ilavesiz örneklerin genel kimyasal kompozisyon, pH ve ağırlık kaybı değerleri

Table 2. General chemical composition, pH and water loss values of breadstick samples non-supplemented and supplemented with chia seeds

CİO (%)	Kül (%)	Yağ (%)	Protein (%)	pH	Ağırlık kaybı (%)
0	0.72 ±0.08 ^b	13.10 ±0.04 ^c	9.21 ±0.07 ^c	5.47 ±0.04 ^b	25.75 ±1.91 ^a
5	0.88 ±0.06 ^{ab}	14.18 ±0.13 ^b	9.53 ±0.03 ^b	5.53 ±0.04 ^{ab}	25.70 ±0.57 ^a
10	1.05 ±0.05 ^a	15.08 ±0.01 ^a	10.04 ±0.13 ^a	5.57 ±0.01 ^a	26.01 ±0.14 ^a

CİO: Chia ilave oranı

Harfler sütunlardaki istatistiksel farkları göstermektedir ($p<0.05$).

Tablo 3. Chia tohumu ilavesinin galeta örneklerinin rengi üzerine etkisi**Table 3.** Effect of chia seed addition on colour values of breadstick samples

CİO (%)	Hamur renk			Pişmiş galeta renk		
	L	a	b	L	a	b
0	66.37 ±3.08 ^a	0.60 ±0.30 ^a	16.31 ±0.97 ^a	53.14 ±3.15 ^a	10.96 ±1.04 ^a	21.07 ±0.07 ^a
5	65.95 ±2.04 ^a	-0.13 ±0.13 ^b	13.96 ±0.51 ^b	52.99 ±0.01 ^a	10.52 ±0.41 ^a	21.01 ±0.10 ^a
10	63.20 ±1.39 ^a	-0.64 ±0.09 ^b	12.37 ±0.08 ^b	53.15 ±2.74 ^a	10.00 ±0.34 ^a	20.77 ±0.42 ^a

CİO: Chia ilave oranı

Harfler sütunlardaki istatistiksel farkları göstermektedir (p<0.05).

Tablo 4. Galetaların antioksidan aktivite değerleri ve toplam fenolik madde miktarları**Table 4.** Antioxidant activity values and total phenolic contents of breadstick samples

CİO (%)	Antioksidan aktivite (µmol TE/100g)	Fenolik madde miktarı (mg GAE/100 g)
0	4.48 ±0.33 ^a	64.12 ±3.95 ^a
5	8.09 ±1.46 ^b	82.79 ±2.43 ^b
10	9.89 ±0.90 ^b	89.56 ±3.80 ^b

CİO: Chia ilave oranı

Harfler sütunlardaki istatistiksel farkları göstermektedir (p<0.05).

Tablo 5. Chia tohumu ilavesinin galetanın duyuşal özellikleri üzerine etkisi**Table 5.** Effect of chia seed addition on sensory properties of breadstick samples

CİO (%)	Renk	Koku	Kırılgnlık	Lezzet	Genel Beğeni
0	5.29 ±0.06 ^a	5.25 ±0.24 ^a	5.17 ±0.59 ^a	4.96 ±0.41 ^a	5.08 ±0.35 ^a
5	5.38 ±0.18 ^a	5.38 ±0.06 ^a	5.25 ±0.35 ^a	5.50 ±0.35 ^a	5.46 ±0.41 ^a
10	5.50 ±0.01 ^a	5.46 ±0.06 ^a	5.59 ±0.12 ^a	5.92 ±0.23 ^a	5.80 ±0.18 ^a

CİO: Chia ilave oranı

Harfler sütunlardaki istatistiksel farkları göstermektedir (p<0.05).

Kontrol örneklerine kıyasla antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarında chia tohumu ilavesi ile gerçekleşen artış chia ilaveli fırıncılık ürünlerinin artan besleyici değeri yanında sağlıklı atıştırmalıklar üretimi için önemli bir ingredient potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur.

Duyusal Değerlendirme

Galeta örneklerinin renk, koku, kırılgnlık, lezzet ve genel beğeni özellikleri panelistler tarafından 7 puanlık hedonik skala kullanılarak değerlendirilmiştir. En yüksek renk (5.50±0.01), koku (5.46±0.06), kırılgnlık (5.59±0.12), lezzet (5.92±0.23), genel beğeni (5.80±0.18) puanlarını % 10 chia tohumu ilaveli galeta örneğinin aldığı görülmüştür (Tablo 5).

Örnekler arasında renk, koku, kırılgnlık, lezzet ve genel beğeni yönünden istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (p<0.05).

Yapılan bir çalışmada chia unu ilaveli kek üretimi gerçekleştirilmiştir. 15g chia unu/100g buğday unu karışımı ile

chia unu ilave edilmeden üretilen keklerin duyuşal özellikleri renk, tat ve tekstür açısından değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda renk ve tat parametrelerinde kontrol örneğine kıyasla chia unu ilaveli örnekte istatistiksel düzeyde anlamlı bir azalış meydana geldiği belirlenirken tekstür değerlerinde herhangi bir fark tespit edilememiştir. Ancak her iki örneğin de genel beğeni değerlerinin kabul edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir (Pizarro ve ark., 2013). Steffolani ve ark., (2014)'nın yaptıkları çalışmada chia unu ve tohumu ilave edilerek üretilen glutensiz ekmeklerde; koku, tat, tekstür, görünüm ve genel kabul edilebilirlik parametreleri duyuşal açıdan değerlendirilmiştir. Örneklerin koku, tat ve genel kabul edilebilirlik puanlarında istatistiksel olarak fark görülmezken, tekstür puanlarında kontrol örneğine göre chia unu ve tohumu ilaveli örneklerde artış meydana geldiği, görünüm değerlerinde chia tohumu ilavesiyle artış, chia unu ilavesiyle azalış meydana geldiği belirtilmiştir.

Sonuç

Chia tohumu ilavesinin galetaların protein, yağ, kül, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri üzerine olumlu etkisinin olduğu görülürken aynı etki pişirme sırasında gerçekleşen ağırlık kaybı ve ürünün renk özelliklerinde görülmemiştir. Duyusal değerlendirme sonuçlarına göre chia tohumu ilaveli ürünler tüketici tarafından kabul görmüş ve kontrol örneği ile farklılık göstermemişlerdir. %10 chia tohumu ilaveli örneğin en yüksek duyusal puanları aldığı bununla birlikte yağ, protein ve kül değerleri ile antioksidan ve fenolik madde miktarlarında diğer örneklerden daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan en yüksek miktar olan %10 chia tohumu ilavesinin duyusal açıdan herhangi bir olumsuz etkisinin olmaması sonraki çalışmalarda daha yüksek oranlarda chia tohumu ilavesinin denenmesinin literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

AACC, (2012). *Approved Methods of Analysis* (11th ed.). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. ISBN 978-1-891127-68-2

Altuğ Onoğur, T., Elmacı, Y., (2011). *Gıdalarda duyusal değerlendirme*. Sıdaş Medya. İzmir, Türkiye. ISBN 978-9944-5660-8-7

AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis* (15th ed.). Arlington, VA, USA. ISBN 978-0935584-42-4

AOAC (1995). *Official Methods of Analysis* (16th ed.). International Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA ISBN 0-935584-54-4

Bodoira, R. M., Penci, M. C., Ribotta, P.D., & Martínez, M.L. (2017). Chia (*Salvia hispánica* L.) oil stability: study of the effect of natural antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 107-113.

Calligaris, S., Pieve, S.D., Kravina, G., Manzocco, L., Nicolli, C.M. (2008). Shelf life prediction of bread sticks using oxidation indices: a validation study. *Journal of food science*, 73(2), 51-56.

Capitani, M.I., Spotorno, V., Nolasco, S.M., Tomás, M.C. (2012). Physicochemical and functional characterization of by-products from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds of Argentina. *LWT-Food Science and Technology*, 45(1), 94-102.

Chicco, A.G., D'Alessandro, M.E., Hein, G.J., Oliva, M.E., Lombardo, Y.B. (2009). Dietary chia seed (*Salvia hispanica* L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *British journal of nutrition*, 101(1), 41-50.

Coelho, M.S., de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2015). Effects of substituting chia (*Salvia hispanica* L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 729-736.

Coorey, R., Grant, A., Jayasena, V. (2012). Effect of chia flour incorporation on the nutritive quality and consumer acceptance of chips. *Journal of Food Research*, 1, 85-95.

Costantini, L., Lukšič, L., Molinari, R., Kreft, I., Bonafaccia, G., Manzi, L., Merendino, N. (2014). Development of gluten-free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredients. *Food chemistry*, 165, 232-240.

Goh, K.K.T., Matia-Merino, L., Chiang, J.H., Quek, R., Soh, S.J.B., Lentle, R.G. (2016). The physico-chemical properties of chia seed polysaccharide and its microgel dispersion rheology. *Carbohydrate polymers*, 149, 297-307.

Iglesias-Puig, E., Haros, M. (2013). Evaluation of performance of dough and bread incorporating chia (*Salvia hispanica* L.). *European Food Research and Technology*, 237(6), 865-874.

Ixtaina, V.Y., Nolasco, S.M., Tomas, M.C. (2008). Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Industrial crops and products*, 28(3), 286-293.

Levent, H. (2017). Effect of partial substitution of gluten-free flour mixtures with chia (*Salvia hispanica* L.) flour on quality of gluten-free noodles. *Journal of Food Science and Technology*, 54(7), 1971-1978.

Mello, B.T.F., Santos Garcia, V.A., Silva, C. (2017). Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds: Optimization Extraction and Fatty Acid Profile. *Journal of Food Process Engineering*, 40(1), e12298.

Mesías, M., Holgado, F., Márquez-Ruiz, G., Morales, F.J. (2016). Risk/benefit considerations of a new formulation of wheat-based biscuit supplemented with different amounts of

- chia flour. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 528-535.
- Peiretti, P.G., Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2), 267-275.
- Pizarro, P.L., Almeida, E.L., Sammán, N.C., Chang, Y.K. (2013). Evaluation of whole chia (*Salvia hispanica* L.) flour and hydrogenated vegetable fat in pound cake. *LWT-Food Science and Technology*, 54(1), 73-79.
- Steffolani, E., Hera, E., Pérez, G., Gómez, M. (2014). Effect of chia (*Salvia hispanica* L.) addition on the quality of gluten-free bread. *Journal of Food Auality*, 37(5), 309-317.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6), 669-675.
- Turabi E., Sumnu G., Sahin S. (2010). Quantitative analysis of macro and microstructure of gluten-free rice cakes containing different types of gums baked in different ovens, *Food Hydrocolloids*, 24, 755-762.
- Verdú, S., Barat, J.M., Grau, R. (2017). Improving bread-making processing phases of fibre-rich formulas using chia (*Salvia hispanica*) seed flour. *LWT-Food Science and Technology*, 84, 419-425.
- Zeppa, G., Rolle, L., Piazza, L. (2007). Textural characteristics of typical italian "grissino stirato" and "rubatà" breadsticks. *Italian Journal of Food Science*, 19(4) 449-459.
- Zettel, V., Hitzmann, B. (2016). Chia (*Salvia hispanica* L.) as fat replacer in sweet pan breads. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(6), 1425-1432.