



Investigation of The Effect of Carvacrol Addition on The Change of Some Physicochemical and Bioactive Properties of Apple Juice Contaminated with *Zygosaccharomyces bailii*

Kevser Karaman^{1,a,*}, Osman Sağdıç^{2,b}

¹Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Erciyes University, 38280 Kayseri, Turkey

²Department of Food Engineering, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Yıldız Technical University, 34349 Istanbul, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 26/07/2019 Accepted : 14/10/2019</p> <p>Keywords: <i>Z. bailii</i> Apple juice Carvacrol Storage Response surface methodology</p>	<p>In this study, the effects of carvacrol addition which is a natural preservative to apple juice samples contaminated with <i>Z. bailii</i> which is an osmotolerant yeast and shows resistance against high sugar concentration, low acidity, ethanol content and pasteurization process, were investigated on some physicochemical and bioactive properties and also changes in yeast numbers during storage period. For this purpose, the response surface methodology was applied and storage time (1-41 days), storage temperature (4-20°C), sodium benzoate amount (0-0.1%) and carvacrol amount (0-750 ppm) were selected as processing variables. Significant changes in physicochemical properties were observed due to yeast viability occurred during the storage of apple juice samples. The increase in the amount of carvacrol caused a decrease in the number of yeasts about 7 log level and prevented the spoilage of fruit juices. However, the brix value of the samples without carvacrol showed a decrease of 50% as a result of yeast activity and the fruit juice could not be consumed. Total phenolic content of the sample was in the range of 136.7-645.7 mg GAE/L and the lowest total phenolic content was determined for the run 11 having no carvacrol while the highest total phenolic content was for the sample added with the highest carvacrol level. As a result of the optimization process, it was observed that the deterioration activities of <i>Z. bailii</i> could be prevented to a great extent by the addition of maximum amount of carvacrol.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(11): 1882-1893, 2019

Karvakrol İlavesinin *Zygosaccharomyces bailii* ile Kontamine Edilmiş Elma Suyunda Bazı Fizikokimyasal ve Biyoaktif Özelliklerin Değişimi Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 26/07/2019 Kabul : 14/10/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>Z. bailii</i> Elma suyu Karvakrol Depolama Tepki yüzey yöntemi</p>	<p>Bu çalışmada yüksek şeker konsantrasyonuna, düşük aside, etanole ve pastörizasyon uygulamasına karşı direnç gösterebilen <i>Z. bailii</i> inhibisyonunda kullanılan karvakrolün, elma suyunun depolama süresi boyunca bazı fizikokimyasal ve biyoaktif özellikleri ile maya sayılarındaki değişimine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla tepki yüzey yöntemi uygulanmış ve proses değişkeni olarak depolama süresi (1-41 gün), depolama sıcaklığı (4-20°C), pozitif kontrol olarak sodyum benzoat miktarı (%0-0,1) ve karvakrol miktarı (0-750 ppm) seçilmiştir. Elma suyu örneklerinde depolama boyunca maya canlılığına bağlı olarak fizikokimyasal özelliklerinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Karvakrol miktarının artışı maya sayısında yaklaşık 7 log düzeyinde bir azalma meydana getirmiş ve meyve sularının bozulmalarını önlemiş, ancak karvakrol içermeyen örneklerde briks değeri maya faaliyeti sonucu yaklaşık %50 düzeyinde azalma göstermiş ve meyve suyu tüketilemeyecek duruma gelmiştir. Toplam fenolik madde değerleri 136,7-645,7 mg GAE/L aralığında tespit edilmiş olup en düşük toplam fenolik madde miktarı karvakrol içermeyen 11 no'lu örnekte tespit edilmişken en yüksek değer ise en yüksek seviyede karvakrol ihtiva eden elma suyu örneğinde belirlenmiştir. Yapılan optimizasyon işlemi sonucunda örneklerin maksimum düzeyde karvakrol ilavesi ile <i>Z. bailii</i>'nin bozucu faaliyetlerinin büyük ölçüde engellenebileceği görülmüştür.</p>

^a kevserkaraman@erciyes.edu.tr ^b <https://orcid.org/0000-0003-0729-6185> | ^c osagdic@yildiz.edu.tr ^d <https://orcid.org/0000-0002-2063-1462>



Giriş

Gıda maddeleri belirli bir zaman dilimi içerisinde çeşitli fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik faktörlerin etkisiyle kalite kaybına uğramakta ve bir süre sonra tüketilemez duruma gelmektedir. Mikrobiyolojik bozulma en yaygın görülen bozulma türü olup özellikle meyve ve sebzelerde kalite kayıplarının oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Meyve ve sebzelerde oluşan mikroorganizma kaynaklı bozulmalar, ciddi ekonomik kayıplara yol açmasının yanında, oluşan toksinler nedeniyle de büyük problemler oluşturabilmektedir (Aksan, 2013).

Meyve suyu çeşitli meyvelerin mekanik işlemlerden geçirilmesinden sonra elde edilen ve üretildiği meyvenin kendine has renk, koku ve aroma niteliklerini taşıyan sıvı bir gıda maddesidir. Meyve suları yapılarında yer alan şeker ve birçok besin bileşeni nedeniyle özellikle küf ve mayalar tarafından kolaylıkla bozulmaya uğratılabilmekte ve önemli kalite kayıpları ortaya çıkabilmektedir. Cemeroğlu ve Acar (1986) maya ve küflerin özellikle meyve ve meyve ürünlerinin birincil doğal mikrobiyotasını oluşturduğunu ifade etmiştir. Mayalar yapıları gereği büyük molekül ağırlıklı bileşenleri metabolize edebilmekte ve şeker içeriği yüksek olan bazı düşük su aktiviteli gıdalarda rahatlıkla gelişerek gıdayı bozabilmektedir (Unluturk ve Turantas, 2002).

Martorell ve ark. (2007) meyve suyu gibi ürünlerde en çok rastlanan bozulma etmeni mayanın *Zygosaccharomyces* cinsi mayalar olduğunu ve bu cins içinde de *Z. bailii* ve *Z. rouxii*'nin ön plana çıktığını ifade etmiştir. Bu mayaların faaliyetleri sonucunda ortamda bulunan heksoz şekerleri degrade olmakta, ortamda etil alkol birikmesi başlamakta ve ürünün tadı bakımından tüketilemez bir hal almaktadır. Ayrıca şeker fermentasyonunun bir sonucu olarak ortamda CO₂ birikmesi nedeniyle ürün ambalajında bombaja yol açmakta ve ürün renginde de önemli değişimler meydana gelmektedir (Cemeroğlu ve Acar 1986, Tournas ve ark., 2006). Mayaların farklı ortamlarda farklı proses uygulamaları ile inaktivasyonunu konu alan çok sayıda çalışma yapılmıştır (Raso ve ark., Fitzgerald ve ark., Kusumegi ve ark., Sağdıç ve ark., 2010, Praphailong ve Fleet, 1997, Palou ve ark., 1997). Karvakrol, kekiğin kendine özgü kokusunu veren uçucu yağların ana bileşenlerinden biridir (Memar ve ark., 2017; Çoban ve Patır, 2010; Gürsoy ve Gürsoy, 2004) ve çok kuvvetli antioksidan ve antimikrobiyal özelliği sebebiyle dikkatleri üzerine çekmiştir (Calo ve ark., 2015; Oussalah ve ark., 2004; Sun, et al., 2014). Karvakrol monotermen yapıda bir bileşik olup bazı patojenler üzerinde çok kuvvetli antimikrobiyal etkiye sahiptir (Sun et al., 2014). Ancak çok uçucu olması ve kısmen düşük suda çözünürlüğe sahip olması nedeniyle kullanım oranları sınırlı kalmıştır (Dorman ve Deans, 2000). Karvakrol Avrupa Komisyonu tarafından tüketici sağlığı açısından herhangi bir risk teşkil etmediği için gıda formülasyonlarında lezzet verici olarak tanınmıştır (European Commission, 1999), ve aynı zamanda Gıda ve İlaç dairesi tarafından da GRAS statüsünde bileşik olarak kabul görmüştür (FDA, 2016). Karvakrol, antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser aktiviteleri gibi klinik uygulamalar için çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Karvakrol, antimikrobiyal aktivitesi, serbest hidroksil grubunun, hidrofobikliğin ve fenol kısmının varlığından

dolayı uçucu yağlarda bulunan diğer uçucu bileşiklerinkinden daha yüksektir. Ayrıca karvakrolün antikanser özellikleri üzerine önemli çalışmalar da mevcuttur (Sharifi-Rad ve ark., 2018; Elshafie ve ark., 2017).

Tepki yüzey yöntemi istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin beraber kullanıldığı, bağımsız değişkenlerin faktör, bağımlı değişkenlerin ise tepki olarak değerlendirildiği bir optimizasyon tekniğidir ve birçok endüstriyel problemin çözümüne önemli katkılar sunabilmektedir. Bu yöntemde tek seferde seçilen bağımsız değişkenlerin çalışılan tepkiler üzerindeki etkileri net olarak gözlenebilmektedir. Klasik yöntemler baz alınarak yapılan çalışmalarda çok sayıda kombinasyon denemesi gereken durumlarda, az sayıda kombinasyon kullanarak test edilmeyen faktör değerleri tepki yüzey yöntemi ile kolaylıkla tahmin edilebilmektedir. Gıda sanayinin önemli alanlarında ürün geliştirme ve problem çözüme amacıyla da güvenilir bir şekilde kullanılabilir (Yılmaz, 2002).

Bu çalışmada elma suyunda yaygın görülen bozulma etmeni bir osmofil maya olan *Z. bailii*'nin karvakrol ilavesi ile inhibisyon olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla farklı süre (1-41 gün), sıcaklık (4-2°C) ve koruyucu konsantrasyonlarında (sodyum benzoat %0-0,1 ve karvakrol 0-750 ppm) elma sularının bazı temel fizikokimyasal ve biyoaktif özelliklerindeki değişim incelemiş ve proses değişkenlerinin çalışılan kalite parametreleri üzerindeki etkisinin matematiksel olarak modellenmesi ve proses şartlarının optimize edilebilmesi amacıyla tepki yüzey yönteminden faydalanılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Elma suyu (Cappy, %100 doğal ve katkısız) tetrapak ambalaj içerisinde Kayseri'de yerel bir marketten satın alınmıştır. *Z. bailii* DSM 70492 suşu Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarında yer alan kültürlerden temin edilmiştir. Karvakrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) Merck (Almanya)'den tedarik edilmiştir.

Örneklerin Hazırlanması ve Maya İnokülasyonu

Z. bailii DSM 70492 Malt extract broth besiyerinde 25°C sıcaklıkta ve 20 saat süreyle iki kez aktive edilmiş ve maya sayıları belirlenerek taze kültür şeklinde 10⁶cfu/ml oranında hazır hale getirilmiştir. Sonrasında 100 ml hacimlere ayrılmış steril durumdaki elma suyuna Çizelge 1'de verilen deneme deseni dikkate alınarak %1 oranında maya inoküle edilmiştir. İnokülasyon sonrasında örneklere pozitif kontrol olarak sodyum benzoat (%0; 0,05 ve 0,1) farklı seviyelerde karvakrol ilavesi yapılmış (0, 375 ve 750 ppm) ve çalkalamanın ardından ilgili depolama sıcaklığında muhafaza için uygun depolama ortamlarına kaldırılmıştır. Örneklere karvakrol ilavesi için sınır değer, yapılan ön duyuşal testler sonrasında belirlenmiş ve maksimum değer 750 ppm olarak tespit edilmiş, bu değer üzerindeki miktarların kabul edilebilirliği azalttığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda 4, 12 ve 20°C sıcaklık değerleri ile 1, 21 ve 41 günlük depolama süreleri belirlenmiştir.

Çizelge 1 Box- Behnken deneme deseni
Table 1 Box Behnken experimental design

D.N	A	B	C	D	Süre (gün)	Sıcaklık (°C)	Sodyum benzoat (%)	Karvakrol (ppm)
1	-1	-1	0	0	1	4	0,05	375
2	-1	0	-1	0	1	12	0	375
3	-1	0	0	-1	1	12	0,05	0
4	-1	0	0	1	1	12	0,05	750
5	-1	0	1	0	1	12	0,1	375
6	-1	1	0	0	1	20	0,05	375
7	0	-1	-1	0	21	4	0	375
8	0	-1	0	-1	21	4	0,05	0
9	0	-1	0	1	21	4	0,05	750
10	0	-1	1	0	21	4	0,1	375
11	0	0	-1	-1	21	12	0	0
12	0	0	-1	1	21	12	0	750
13	0	0	0	0	21	12	0,05	375
14	0	0	0	0	21	12	0,05	375
15	0	0	0	0	21	12	0,05	375
16	0	0	1	-1	21	12	0,1	0
17	0	0	1	1	21	12	0,1	750
18	0	1	0	0	21	20	0	375
19	0	1	0	-1	21	20	0,05	0
20	0	1	0	1	21	20	0,05	750
21	0	1	1	0	21	20	0,1	375
22	1	-1	0	0	41	4	0,05	375
23	1	0	-1	0	41	12	0	375
24	1	0	1	-1	41	12	0,05	0
25	1	0	1	1	41	12	0,05	750
26	1	0	1	0	41	12	0,1	375
27	1	1	0	0	41	20	0,05	375

A, B, C ve D sırasıyla süre (gün), sıcaklık (°C), sodyum benzoat (%) ve karvakrol (ppm)'ü ifade etmektedir.

Fizikokimyasal Analizler

Elma suyu örneklerinin pH değerleri pH metre cihazı ile (Inolab terminal, Germany) 25°C sıcaklıkta ölçülmüştür. Titrasyon asitliği değerleri ise ayarlı NaOH (0,1 N) çözeltisi ile fenoltaleyn indikatörü eşliğinde belirlenmiş ve sonuçlar % toplam asitlik olarak malik asit cinsinden hesaplanmıştır. Örneklerin bulanıklık değerleri otomatik turbidimetre cihazı ile (Hach 2100, USA) tespit edilmiş ve sonuçlar NTU cinsinden verilmiştir. Elma suyu örneklerinin briks değerleri otomatik refraktometre (Reichert AR 700 Automatic Refractometer, ABD) ile 25°C sıcaklıkta kaydedilirken renk değerleri ise otomatik renk tayin cihazı (Lovibond RT Series Reflectance Tintometer U.K) kullanılarak belirlenmiş ve L^* , a^* ve b^* cinsinden verilmiştir.

Biyoaktivite Analizleri

Elma suyu örneklerinin toplam fenolik madde miktarları (TFM) Singleton ve Rossi (1965) tarafından bildirilen metot dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla uygun oranlarda seyreltilen elma suyu örneklerinden 40 µl alınmış ve 2400 µl su ile karıştırılmıştır. Daha sonra 200 µl Folin-Ciocalteu reagenti ilave edilmiş ve sonrasında da 600 µl Na₂CO₃ (%20 a/v) ilavesi yapılmıştır. Vortekslenen tüpler oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 2 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda örneklerin 765 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit standardı ile çizilen kalibrasyon kütresi kullanılarak mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/L) olarak verilmiştir.

Örneklerin antiradikal aktivite değerleri DPPH radikali (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl-Aldrich Chem., USA) kullanılarak tespit edilmiştir (Tezcan ve ark., 2009). Bu amaçla 200 µl elma suyu örneği 4 mL DPPH solüsyonu ile (0,1 mM) karıştırılmış ve sonrasında karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 30 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda hem DPPH solüsyonunun hem de örneklerin absorbans değerleri kaydedilmiş ve örneklerin antiradikal aktivite değerleri % inhibisyon şeklinde aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%Inh = \frac{(\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}})}{\text{Absorbans}_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Örneklerin antioksidan kapasite değerleri fosfomolibden yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Prieto ve ark., 2009). Bu amaçla, 0,4 mL örnek, 4 mL test çözeltisi ile (0,6 M sülfirik asit (Aldrich Chem., USA), 28 mM sodyum fosfat (Merck Chem., Germany) ve 4 mM amonyum molibdat (Merck Chem., Germany) karıştırılmış ve test tüpleri vortekslenildikten sonra su banyosunda 95°C sıcaklıkta 90 dk süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda örneklerin absorbans değerleri 695 nm'de kaydedilmiş ve sonuçlar askorbik asit standardı ile çizilen kalibrasyon kütresi kullanılarak mg askorbik asit eşdeğeri (mg AAE/L) olarak verilmiştir.

Mikrobiyolojik analiz

Depolama süresince elma suyu örneklerinde *Z.bailii*'nin canlılığı, koloni sayılarını belirlemek suretiyle

test edilmiştir. Bu amaçla ilgili elma suyu örneğinden seri dilüsyonlar hazırlanmış ve Malt ekstrakt agar üzerine dökme plak yöntemi ile ekimler yapılmıştır. Daha sonra ekim yapılan petripler 25°C sıcaklıkta 24-48 saat süreyle inkübe edilmiş ve süre sonunda 30-300 arası koloni içeren petripler sayılarak elma suyu örneklerinin *Z.bailii* sayıları log cfu/ml şeklinde verilmiştir.

Veri Analizi ve Tepki Yüzey Yöntemi ile Modelleme

Mevcut çalışmada dört faktör ve üç seviyeden oluşan ve merkez noktasında üç tekerrürlü deneme içeren Box-Behnken deneme tasarımı kullanılmış ve örnekler bu tasarıma göre oluşturulan Çizelge 1 dikkate alınarak hazırlanmıştır. Bu bağlamda oluşturulan deneme tasarımı, proses değişkenleri, seviyeleri ile kodlu ve kodsuz değerleri Çizelge 1’de verilmiştir. Proses parametrelerinin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisi Denklem 1’deki polinomiyal model dikkate alınarak belirlenmiş ve her bir parametre için ayrı ayrı tanımlayıcı regresyon denklemleri oluşturulmuştur.

$$Y-\varepsilon=\beta_0+\sum_{i=1}^N\beta_i\chi_i+\sum_{i=1}^N\beta_{ii}\chi_i^2+\sum_{i=1,i<j}^N\sum_{j=i+1}^N\beta_{ij}\chi_i\chi_j \quad (1)$$

Burada Y bağımlı değişken olan tahminlenecek parametreyi, β_0 kesen değeri, β_i lineer terimi, β_{ij} interaksiyon terimi, β_{ii} ise kuadratik terimi, x_i ya da x_j ise bağımsız değişkenlerin kodlu değerlerini ifade etmektedir.

Deneyel noktaların dizaynı, randomizasyonu, varyans analizi, ikinci derece polinomiyal denklemlerin uyarlanması ve grafiksel gösterimler istatistiksel bir paket programı olan Design-Expert® Software Version 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular ve tartışma

Elma Suyu Örneklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Çizelge 2 elma suyu örneklerine ait fizikokimyasal analiz sonuçlarını, Çizelge 3 proses değişkenlerinin ilgili tepki değeri üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemini ortaya koyan F değerlerini ve Çizelge 4’de modellemeler sonrasında oluşturulan tahminleyici regresyon denklemleri ve bu denklemlere ait determinasyon katsayısı değerlerini göstermektedir. Çizelge 2’de görüldüğü üzere elma suyu örneklerinde fizikokimyasal özellikler kapsamında pH, toplam asitlik, briks ve bulanıklık değerleri ile renk parametreleri belirlenmiştir. Elma suyu örneklerinin pH değerleri depolama süresince 3,25-3,68 aralığında değişim göstermiş ve en yüksek pH değeri depolamanın ilerleyen safhalarında görülmüştür. Genel olarak bakıldığında elma suyu örneklerinin pH değeri, depolama sıcaklığı ve süresine bağlı olarak artış göstermiş, pozitif kontrol olarak kullanılan sodyum benzoat miktarının artışı da pH değerlerini yükseltmiştir (Şekil 1). Benzer şekilde Gao ve Rupasinghe (2012) elma-havuç suyu karışımının 28 günlük depolama sonucunda pH değerinde önemli bir artış meydana geldiğini bildirmiştir. Karvakrol ilavesinin pH üzerindeki etkisi önemsiz bulunurken, süre, sıcaklık ve sodyum benzoat ilavesi istatistiksel olarak önemli bir etki göstermiştir (Çizelge 3, P<0,05). Örneklerin pH değerlerini tahminlemeye yönelik kurulan regresyon modelinin

determinasyon katsayısı da oldukça yüksek ve bu bağlamda güvenilir bulunmuştur (Çizelge 4). Genel olarak bakıldığında ise koruyucu içermeyen örneklerde düşük pH değerine nazaran asidik koşullarda *Z. bailii* gelişimi gözlenmiştir. Praphailong ve Fleet (1997) ile Evans ve ark. (2004) mayaların özellikle düşük pH ve yüksek şeker içeriğine sahip gıdalarda bozulmadan sorumlu organizmalar olduğunu bildirmiş ve örneğin *Z.rouxii* mayasının yüksek şeker konsantrasyonunda geniş bir pH aralığında canlı kalabildiği ifade edilmiştir (Tokuoka, 1993).

Örneklerin briks değerleri 7,11-12,81 aralığında değişmiş, genel olarak koruyucu içermeyen elma suyu örneklerinin briks değerleri mikrobiyal bozulmaya bağlı olarak önemli ölçüde düşüş sergilerken, koruyucu ilavesi ile briks değerlerindeki düşüş önemli ölçüde azalmıştır. En düşük briks değerleri karvakrol ilavesi yapılmayan 11 ve 24 nolu deneme noktalarında gözlenmiştir. Örneklerin briks değerleri üzerine sadece karvakrol ilavesinin etkisi hem lineer hem de kuadratik olarak önemli bulunmuş (P<0,001, Çizelge 3), diğer proses parametreleri briks değerlerinde nispeten bir değişime yol açmış olsa da bu değişim önemli bulunmamıştır (P<0,05). Şekil 1’den net olarak görüleceği üzere karvakrol ilavesinin artışıyla örneklerin briks değerleri önemli ölçüde korunmuş, karvakrolün azalmasıyla *Z.bailii* faaliyeti sonucu şekerlerin metabolize edilmesi nedeniyle briks değerleri düşmeye başlamıştır. Leandro ve ark. (2011) *Z.bailii* mayasının fruktofilik bir maya olduğunu ve gelişimine bağlı olarak ortamda bulunan fruktozu glukozu nazaran daha hızlı parçaladığını ifade etmiştir. Martorell ve ark. (2007) *Z.bailii* mayasının ortalama %72’lik glukoz konsantrasyonunda gelişebildiğini ifade etmiş, *Z.rouxii*’ye nazaran daha ılımlı bir osmotolerant maya olduğunu bildirmiştir.

Elma örneklerinin toplam asitlik değerleri %5,13-5,96 aralığında değişim göstermiş olup depolamanın başlangıcında pH paralelinde yüksek olan değerler, ilerleyen süre zarfında düşüş göstermiş ve örneklerin toplam asitlik değerleri üzerinde depolama süresinin etkisi önemli bulunmuştur (P<0,05). Örneklerin toplam asitlik değerleri karvakrol ilavesi ile nispeten bir azalma sergilemiş olsa da bu değişim önemli bulunmamıştır (P>0,05, Çizelge 3, Şekil 1). Buna ilave olarak depolama süresi ile karvakrol interaksiyonu önemli bir etki göstermiştir (P<0,05, Çizelge 3).

Örneklerin bulanıklık değerleri 10,8-454 NTU aralığında değişim sergilemiştir. En yüksek bulanıklık değeri hiç koruyucu içermeyen ve bunun sonucu olarak yüksek oranda maya gelişimi sebebiyle 11 no’lu örnekte ölçülürken, en düşük bulanıklık değeri her iki koruyucuyu da içeren 6 nolu elma suyu örneğinde tespit edilmiştir (Çizelge 2). Örneklerin bulanıklık değerleri üzerinde tüm proses faktörlerinin lineer etkisi önemsiz bulunmuştur (P>0,05, Çizelge 3). Örneklerin briks değerleri ile bulanık değerleri arasında önemli ve negatif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (r=-0,898, P<0,05). Koruyucu kullanımına bağlı olarak *Z. bailii* gelişimindeki artış ve dolayısıyla ortaya çıkan metabolitler meyve sularında bulanıklık oluşumuna yol açmıştır. Bu bağlamda örneklerin bulanıklık değerleri depolama süresi ile artış gösterirken (P>0,05, Çizelge 3) karvakrol ve sodyum benzoat kullanımındaki artışa paralel olarak azalmıştır (P>0,05, Çizelge 3, Şekil 1).

Çizelge 2 Karvakrol ilavesinin *Z. bailii* ile inoküle edilmiş elma sularında bazı fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve biyoaktif özellikler üzerine etkisi

Table 2 The effect of carvacrol addition on some physicochemical, microbiological and bioactive properties of apple juices inoculated with *Z. bailii*

D.N	S	SC	SB	K	pH	TA	Briks	B	L*	a*	b*	ARA	TFM	AA	Z
1	1	4	0,05	375	3,47	5,80	11,98	14,23	5,21	2,08	5,26	64,94	280,37	124,14	<1
2	1	12	0	375	3,39	5,74	11,99	15,50	5,88	2,32	6,39	64,51	280,37	155,17	<1
3	1	12	0,05	0	3,48	5,90	12,06	14,27	6,92	3,20	8,18	63,55	172,37	117,56	4,46
4	1	12	0,05	750	3,48	5,75	11,86	14,10	5,43	2,31	6,11	67,01	310,03	156,92	<1
5	1	12	0,1	375	3,55	5,91	11,94	12,00	5,15	1,82	4,90	67,25	289,03	101,60	<1
6	1	20	0,05	375	3,47	5,96	12,12	10,87	6,45	3,33	8,32	67,16	269,03	157,00	<1
7	21	4	0	375	3,25	5,54	12,10	27,43	5,23	2,12	6,28	68,40	201,70	98,59	<1
8	21	4	0,05	0	3,31	5,21	12,13	22,83	4,33	1,61	4,77	67,52	142,70	100,89	<1
9	21	4	0,05	750	3,30	5,36	12,28	30,97	5,91	2,24	6,30	69,03	311,70	115,81	<1
10	21	4	0,1	375	3,47	5,24	12,09	23,67	6,12	2,44	6,88	63,51	213,37	119,70	<1
11	21	12	0	0	3,33	5,46	8,25	454,00	16,73	4,86	17,50	60,20	136,70	52,32	7,71
12	21	12	0	750	3,31	5,41	11,94	41,93	6,77	2,43	7,15	65,58	292,37	121,21	<1
13	21	12	0,05	375	3,45	5,24	12,11	30,37	4,21	1,71	4,92	66,52	337,70	122,87	<1
14	21	12	0,05	375	3,44	5,21	12,07	33,93	4,00	1,59	4,50	67,08	341,03	111,13	<1
15	21	12	0,05	375	3,44	5,25	11,95	30,73	4,66	1,70	4,55	67,80	339,70	123,51	<1
16	21	12	0,1	0	3,52	5,13	12,05	29,40	4,33	1,71	4,59	67,23	221,37	116,92	<1
17	21	12	0,1	750	3,49	5,22	12,02	27,50	3,67	1,68	4,35	69,05	442,03	153,03	<1
18	21	20	0	375	3,30	5,16	11,85	32,47	4,84	1,98	5,39	65,38	345,37	124,14	<1
19	21	20	0,05	0	3,43	5,42	8,00	221,67	12,88	4,54	15,58	62,77	222,70	47,00	7,49
20	21	20	0,05	750	3,39	5,24	12,05	25,40	3,17	1,65	4,02	68,60	476,03	126,84	<1
21	21	20	0,1	375	3,44	5,35	12,08	24,77	4,06	1,62	4,09	68,67	405,03	117,08	<1
22	41	4	0,05	375	3,60	5,30	12,11	32,10	5,58	1,85	5,74	61,89	584,37	118,35	<1
23	41	12	0	375	3,52	5,47	12,63	44,70	5,03	2,24	15,44	60,46	643,37	141,84	<1
24	41	12	0,05	0	3,68	5,27	7,11	295,33	15,44	4,73	16,83	57,98	364,03	20,25	7,03
25	41	12	0,05	750	3,62	5,29	12,49	38,90	6,35	3,11	8,65	61,96	645,70	126,13	<1
26	41	12	0,1	375	3,68	5,44	12,81	36,90	5,60	2,75	7,45	63,42	571,70	167,48	<1
27	41	20	0,05	375	3,61	5,36	12,61	31,73	5,87	2,52	7,28	59,17	554,37	158,19	<1

DN: Denem noktası, S: Süre (gün), SC: Sıcaklık (°C), SB: Sodyum benzoat (%), K: Karvakrol (ppm), T: TA (%), B: Bulanıklık (NTU), ARA: Antiradikal aktivite (% Inh.), TFM: Toplam fenolik madde (mg GAE/L), AA: Antioksidan aktivite (mg AAE/L), Z: *Z. bailii* (log cfu/mL)

Çizelge 3 Proses değişkenlerinin çalışılan parametreler üzerine etkisini gösteren ANOVA sonuçları (F değerleri)

Table 2 ANOVA results showing the effect of process variables on the studied parameters (F values)

	Df	pH	Briks	TA	B	L*	a*	b*	TFM	AA	ARA	Z
M	14	27,5	3,092	11,11	3,830	2,711	2,576	4,031	12,13	1,942	6,166	4,766
A ^φ	1	22,81***	2,037	41,03***	1,840	0,003	1,128	0,018	0,938***	3,939	7,763***	0,007
B	1	18,42**	1,051	0,919	0,008	0,999	1,010	1,870	0,623**	0,000	0,670	1,784
C	1	18,97**	0,493	5,927	0,190	1,683*	1,454	1,794	0,192	0,030	0,007**	1,333
D	1	1,67	0,905***	0,021	0,680	1,558***	2,245**	1,585	2,358***	0,921***	1,271***	6,771***
AB	1	0,051	0,035	0,253	0,006	0,038	0,173	0,095	0,027	0,015	2,233	0,000
AC	1	0,013	0,013	1,085	0,001	0,073	0,523	1,732	0,517	2,017	0,003	0,000
AD	1	2,16	0,015	6,607**	4,150	0,121	0,231	0,148	0,184	0,255	6,134**	0,000
BC	1	1,16	8,192**	0,670	0,004	2,513	0,269	1,531	1,662	1,422	0,025	0,818
BD	1	0,259	3,972*	2,848	3,93	5,526**	6,281**	7,030**	0,570	1,355	1,706	6,966**
CD	1	0,03	3,626*	0,465	7,460*	3,754*	2,936	4,178*	0,338	0,345	1,161	7,376**
A ²	1	111,2***	0,041	59,01***	0,420	1,284	4,624*	5,163**	17,745***	1,592	23,34***	0,279
B ²	1	17,07***	0,011	1,120	0,430	0,000	0,148	0,019	0,547	0,024	0,000	0,082
C ²	1	4,73*	0,045	2,035	0,170	0,222	0,143	1,182	0,308	0,230	0,325	0,058
D ²	1	1,94	6,763**	0,046	6,770*	7,291**	8,414**	7,176**	4,539*	3,020*	1,278	13,11***
R	12											
U	10	17,43	159,44***	26,19***	288***	61,10***	136,9***	140,8***	1328,9***	18,992	7,667	0,00
P	2											
CO	26											
R ²		0,97	0,78	0,93	0,81	0,76	0,75	0,82	0,93	0,69	0,88	0,85

M: Model, A, B, C ve D sırasıyla süre (gün), sıcaklık (°C), sodyum benzoat (%) ve karvakrol (ppm)'ü ifade etmektedir. B: Bulanıklık, TFM: Toplam fenolik madde, ARA: Antiradikal aktivite, AA: Antioksidan aktivite, Z: *Z. bailii*, R: Residual, U: Uyum eksikliği, P: Pure error, CO: Cor error

Çizelge 4 Her bir proses değişkeninin etkisini gösteren tahminleyici polinomial regresyon denklemleri
Table 4 Predictive polynomial regression equations showing the effect of each process variable

Parametreler	Regresyon modelleri*	R ²
pH	$Y_{pH} = 3,44+0,07A+0,01B+0,08C-0,01D+0,00AB-0,00AC-0,02BC-0,01AD-0,00BD-0,00CD+0,13A^2-0,05B^2-0,02C^2-0,01D^2$	0,97
Briks	$Y_{Briks} = 12,04-0,18A-0,33B+0,35C+1,08D+0,09AB+0,05AC+0,06BC+1,39AD+0,97BD-0,92CD+0,08A^2+0,04B^2+0,09C^2-1,09D^2$	0,78
Toplam asitlik	$Y_{asitlik} = 5,23-0,24A+0,00B-0,04C-0,01D-0,02AB-0,05AC+0,12BC+0,04AD-0,08BD+0,03CD+0,32A^2+0,04B^2+0,06C^2+0,00D^2$	0,93
Bulanıklık ^φ	$Y_{Bulanıklık} = 31,67+0,32A+0,71B-121,5C-0,02D+0,00AB-0,03AC-0,00BC-0,21AD-0,00BD+0,19CD-0,00A^2-0,01B^2+194,4C^2+0,00D^2$	0,81
L*	$Y_{L^*} = 4,29+0,73A+0,40B-1,29C-2,44D-0,23AB+0,32AC-0,41BC-1,90AD-2,82BD+2,32CD+1,17A^2-0,02B^2+0,49C^2+2,80D^2$	0,76
a*	$Y_{a^*} = 1,66+0,17A+0,27B-0,32C-0,60D-0,14AB+0,25AC-0,16BC-0,18AD-0,87BD+0,6CD+0,65A^2+0,11B^2+0,11C^2+0,87D^2$	0,75
b*	$Y_{b^*} = 4,65+1,85A+0,78B-2,15C-2,57D-0,38AB-1,62AC-0,47BC-1,52AD-3,27BD+2,52CD+2,43A^2-0,15B^2+1,16C^2+2,86D^2$	0,82
TFM	$Y_{TFM} = 339,47+146,86A+44,86B+20,22C+101,5D-4,66AB-20,08AC+12BC+36AD+21,08BD+16,25CD+101,86A^2-17,88B^2-13,43C^2-51,51D^2$	0,93
ARA	$Y_{ARA} = 67,13-2,46A-0,29B+1,21C+1,83D-1,23AB+0,05AC+2,04BC+0,13AD+1,07BD-0,89CD-3,45A^2+0,01B^2-0,40C^2-0,80D^2$	0,69
AA	$Y_{AA} = 119,16-6,67A+4,39B+6,87C+28,75D+1,74AB+19,80AC-7,04BC+16,62AD+16,23BD-8,19CD+15,23A^2-1,87B^2+5,79C^2-20,98D^2$	0,88
Z.bailii sayısı	$Y_{bailii} = 0,21A+0,62B-0,64C-2,22D+0,00AB+0,00AC+0,00BC-0,64AD-1,87BD+1,92CD+0,32A^2-0,17B^2-0,14C^2-2,22D^2$	0,85

^φ Karekök transformasyon uygulanmıştır, A, B, C ve D sırasıyla süre (gün), sıcaklık (°C), sodyum benzoat (%) ve karvakrol (ppm)'ü ifade etmektedir, TFM: Toplam fenolik madde, ARA: Antiradikal aktivite, AA: Antioksidan aktivite

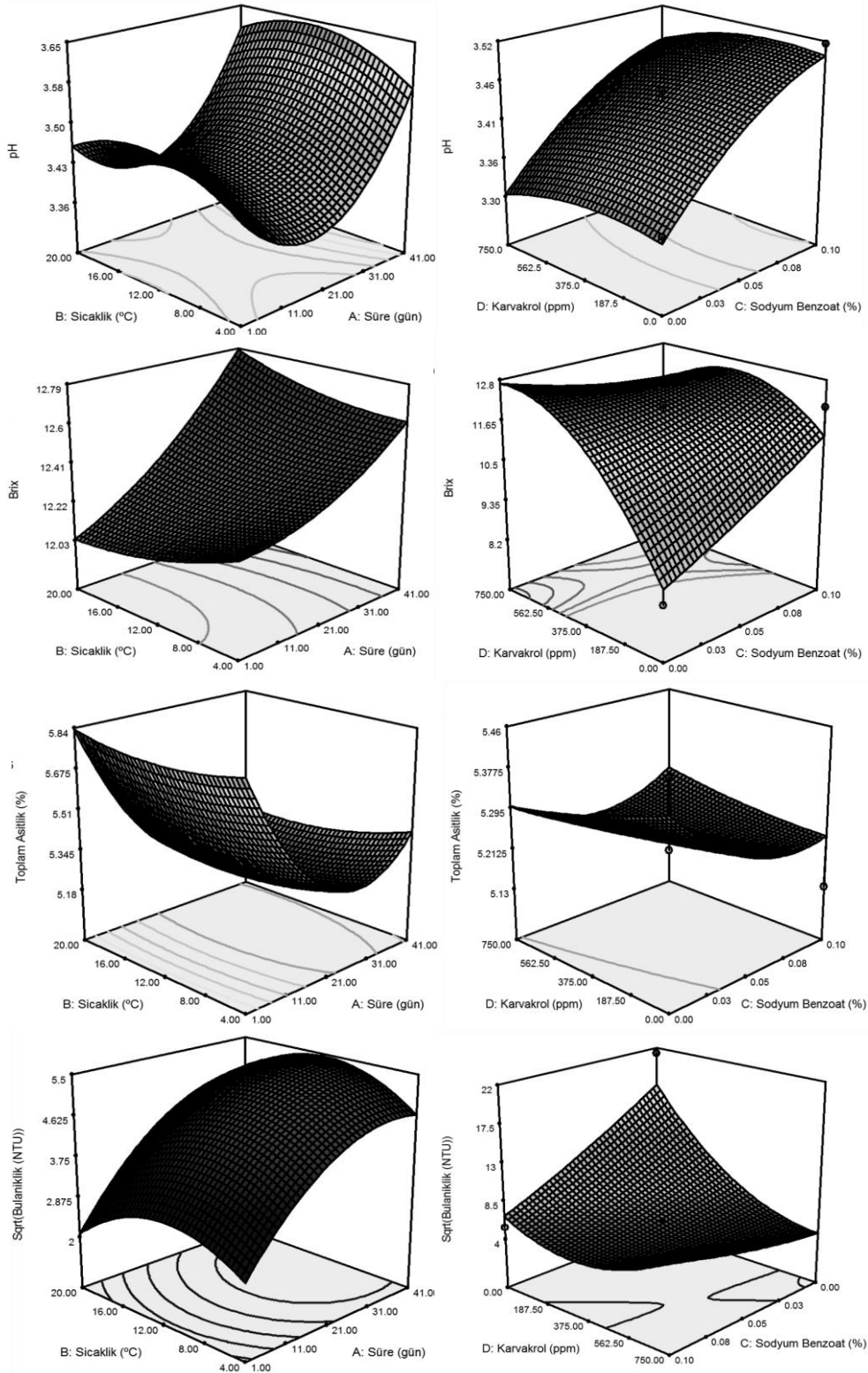
Elma suyu örneklerinin depolama süresince renk değişimleri tespit edilmiş ve L*, a* ve b* değerleri olarak kaydedilmiştir. Örneklerin L* değerleri 3,17-16,73 aralığında, a* değerleri 1,59-4,86 aralığında ve b* değerleri de 4,02-17,5 aralığında değişim göstermiştir. Örneklerin depolama süresi boyunca renk değerlerinde meydana gelen değişim önemli bulunmuş, L* değerleri üzerine her iki koruyucu da etkili olurken, a* değerleri üzerine karvakrol ilavesi etkili bulunmuştur (P<0,05, Çizelge 3). b* değerleri üzerine ise çalışılan proses değişkenlerinin lineer etkisi önemsiz bulunmuştur (P>0,05, Çizelge 3). Şekil 2'de görüldüğü üzere, depolama süresi arttıkça L* değeri yükselirken, karvakrol artışı ile L* değerlerinde önemli seviyede düşüş gözlenmiştir (P<0,05; Çizelge 3). Benzer etkiler a* değerleri için de gözlenmiş, süre ve sıcaklık artışı a* değerlerini yükseltmiş, karvakrol ve sodyum benzoat artışı ile a* değerleri azalma eğilimi göstermiştir. b* değerleri ise depolama süresi ile keskin bir artış sergilerken, koruyucuların ilavesi elma suyunun b* değerlerini düşürmüştür (P>0,05). Her üç renk parametresi de örneklerin briks değerleri ile negatif ve önemli bir korelasyon gösterirken ($r_{L^*,briks}=-0,916$, $r_{a^*,briks}=-0,803$ ve $r_{b^*,briks}=-0,753$; P<0,05) bulanıklık değerleri ile pozitif ve önemli bir korelasyon sergilemiştir ($r_{L^*,bulanıklık}=0,936$, $r_{a^*,bulanıklık}=0,814$ ve $r_{b^*,bulanıklık}=0,813$; P<0,05). Gao ve Rupasinghe (2012) 21 gün boyunca depolanan elma-havuç suyu örneklerinde depolamaya bağlı olarak renk değişimi meydana geldiğini, bulanıklık oluşumunun hızlandığını ve bunun temel sebebinin de mikrobiyal gelişime bağlı olarak artan organizma sayısı olduğunu ifade etmiştir.

Elma suyu örneklerinin biyoaktif özellikleri

Z.bailii ile kontamine edilmiş elma suyu örneklerinin depolama süresince biyoaktif özellikleri üzerindeki etkisi takip edilmiş ve bu bağlamda örneklerin toplam fenolik

madde, antiradikal aktivite ve antioksidan kapasite değerlerindeki değişim belirlenmiştir. Toplam fenolik madde değerleri 136,7-645,7 mg GAE/L aralığında tespit edilmiş olup en düşük toplam fenolik madde miktarı karvakrol içermeyen 11 no'lu örnekte tespit edilmişken, en yüksek toplam fenolik madde miktarı en yüksek seviyede karvakrol ihtiva eden elma suyu örneğinde ve depolamanın sonunda belirlenmiştir. Proses parametreleri olan süre ve sıcaklık ile karvakrol ilavesinin elma suyunun toplam fenolik madde miktarlarını önemli seviyede yükselttiği gözlenmiştir (P<0,05, Çizelge 3, Şekil 3). Depolama süresine bağlı olarak örneklerin toplam fenolik madde miktarlarında önemli bir artış meydana geldiği gözlenmiştir (P<0,05; Çizelge 3). Klimczak ve ark. (2007) Folin reagentinin sadece fenoller ile değil, aynı zamanda karotenoidler, aminoasitler ve şekerler ile de reaksiyon verdiğini ifade etmiştir. Bu bağlamda düşünüldüğünde depolamaya bağlı olarak örneklerin toplam fenolik madde miktarlarında önemli seviyede artış olması, mikrobiyal faaliyete bağlı olarak ortaya çıkan bazı bileşiklerin etkisine bağlanmıştır. Örneklerin serbest radikal süpürücü gücünü ortaya koyan antiradikal aktivite değerleri DPPH radikali kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. Örneklere ait antiradikal aktivite değerleri %57,98-69,03 aralığında değişim sergilemiştir.

Örneklerin antiradikal aktivite değerleri üzerinde süre, sodyum benzoat ve karvakrol ilavesinin lineer etkileri önemli bulunmuştur (P<0,05; Çizelge 3). Depolama süresinin artışına bağlı olarak örneklerin radikal süpürücü gücü zayıflarken, karvakrol ilavesinin artışıyla aktivite değerleri önemli seviyede artış göstermiştir (Şekil 3). Örneklerin antiradikal aktivitesi ile toplam fenolik madde miktarları arasında ise net bir korelasyon tespit edilememiştir.



Şekil 1 Proses parametrelerinin *Z. bailii* ile kontamine edilmiş elma suyu örneklerinin bazı fizikokimyasal özelliklerinin (pH, briks, toplam asitlik, bulanıklık) değişimi üzerine etkisi
 Figure 1 Effect of process parameters on the change of some physicochemical properties (pH, brix, total acidity, turbidity) of apple juice samples contaminated with *Z. bailii*

Elma suyu örneklerinin antioksidan kapasitesi fosfomolibden yöntemi ile test edilmiş ve sonuçlar askorbik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanmıştır. Örneklere ait antioksidan kapasite değerleri 20,25-167,48 mg AAE/L aralığında değişim sergilemiştir. Örneklerin antioksidan kapasiteleri üzerine proses parametreleri içinde sadece karvakrol ilavesinin etkisinin olduğu gözlenmiş, diğer

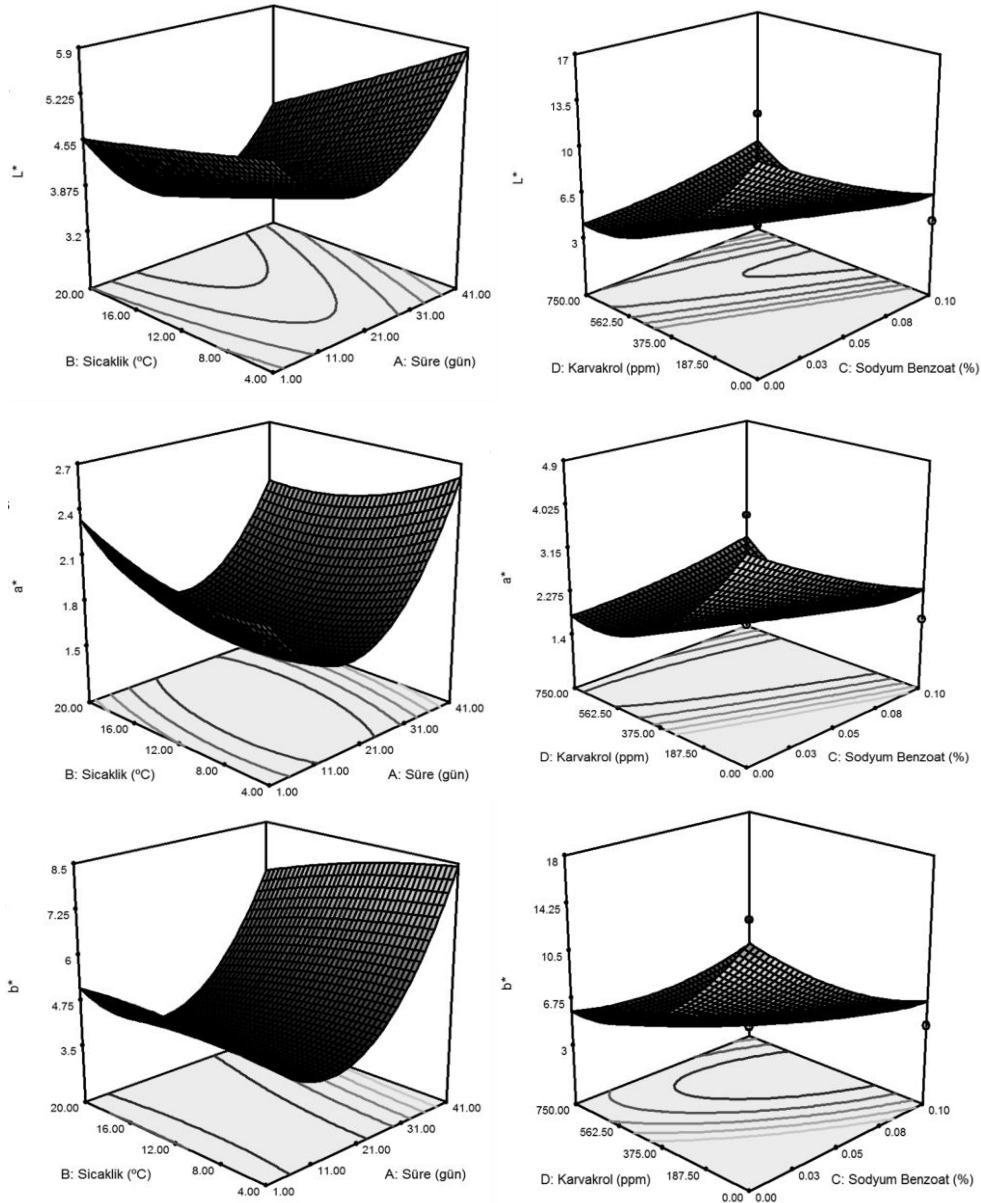
parametreler etkisiz bulunmuştur. Karvakrol miktarının artışı örneklerin antioksidan kapasite değerlerini önemli ölçüde artırmıştır (Şekil 3). Çizelge 2'den de görülebileceği üzere en düşük antioksidan kapasite değerleri hiç karvakrol ilavesi yapılmamış elma suyu örneklerinde tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde ile antioksidan kapasite değerleri arasında korelasyon

gözlenmiş ancak istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte örneklerin briks değerleri ile pozitif, bulanıklık değerleri ile de negatif bir korelasyon sergilemiştir.

Elma Suyu Örneklerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

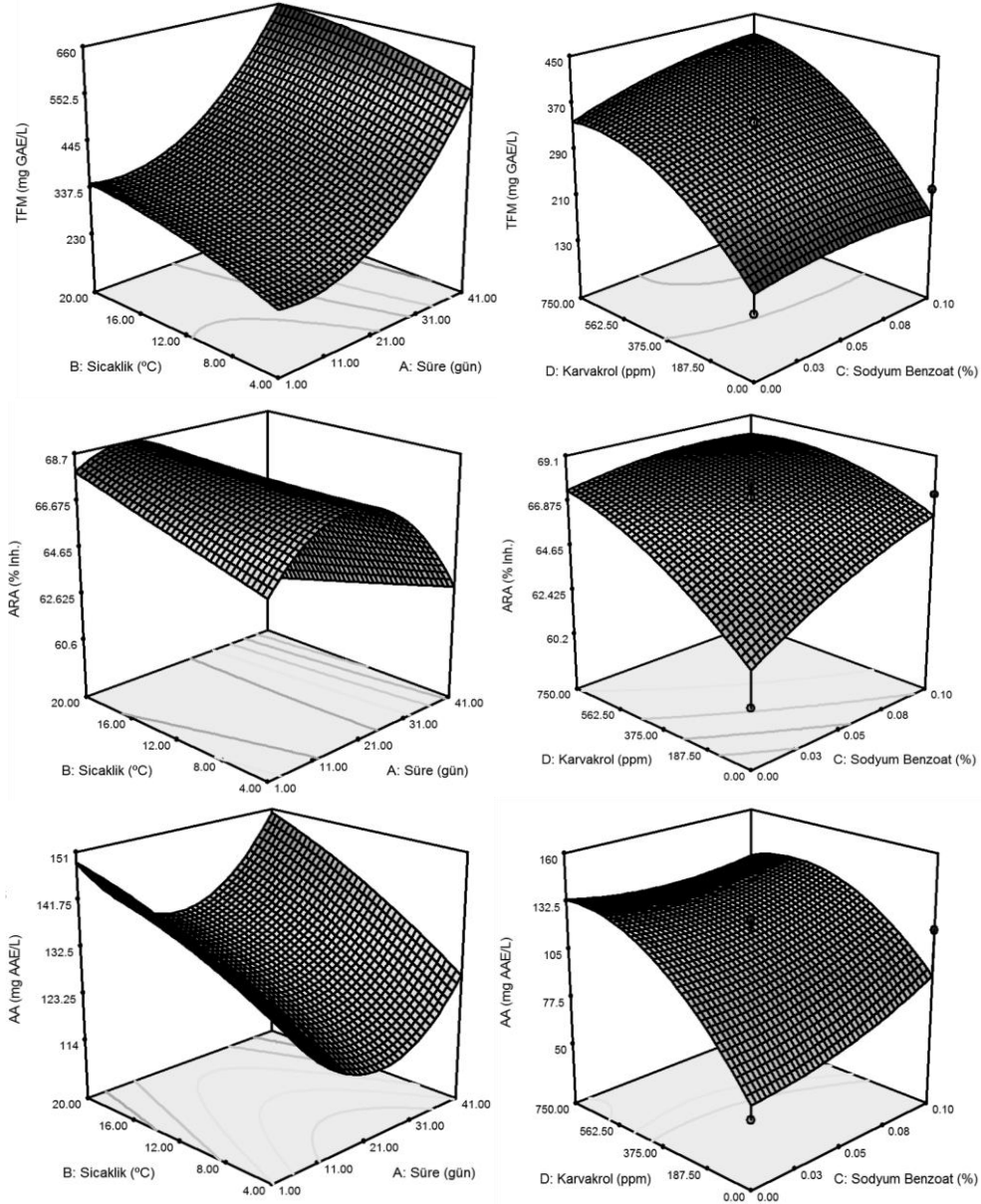
Örneklerin mikrobiyolojik özellikleri kapsamında başlangıçta inoküle edilen *Z. bailii* gelişimi ve depolama süresince proses parametrelerine bağlı olarak örneklerin *Z. bailii* sayısındaki değişim tespit edilmiştir. Çizelge 2 örneklerin *Z. bailii* sayılarını göstermektedir. Görüldüğü üzere birçok elma suyu örneğinde herhangi bir maya gelişimi tespit edilememiş ve <1 log cfu/mL olarak ifade edilmiştir. En yüksek maya sayısı değeri herhangi bir koruyucu içermeyen 11 nolu elma suyu örneğinde tespit edilirken, bunu yine karvakrol ilavesinin olmadığı 19 ve 24 nolu örnekler takip etmiştir. Elma suyunda bozulma etmeni maya olan *Z. bailii* üzerine karvakrol oldukça önemli inhibisyon etkisi göstermiş, Şekil 4'te görüleceği üzere

karvakrol miktarının artışıyla *Z. bailii* sayısında oldukça önemli bir düşüş meydana gelmiştir ($P<0,05$, Çizelge 3). Bu çalışmada en çok dikkat çeken sonuçlardan biri sodyum benzoat ile birlikte karvakrole bağlı olarak maya gelişiminin sınırlanması yerine, beklenen aksine maya sayısının artış göstermesidir. Karvakrolün lineer etkisi *Z. bailii*'yi inhibe ederken, sodyum benzoat ile interaksiyon etkisi sinerji yerine antagonizm oluşturmuştur. Benzer olarak *Aspergillus flavus*'un gelişimi üzerine tarçın ekstraktı ve sodyum benzoat karışımlarının araştırıldığı çalışmada 400 ppm tarçın ekstraktı ve 12,5; 25; 50 ppm sodyum benzoat karışımları ile 100 ppm sodyum benzoat ve 200 ppm tarçın ekstraktı sinerji yerine antagonistik etki göstermiştir. Yazarlar bu çalışmada antimikrobiyeller bireysel kullanıldığında MIC (minimum inhibitör konsantrasyonu) değerlerinin kullanıldığını ancak antimikrobiyellerin beraber kullanımlarında FIC (fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu) değerinin kullanıldığını belirtmişlerdir.



Şekil 2 Proses parametrelerinin *Z. bailii* ile kontamine edilmiş elma suyu örneklerinin renk özelliklerinin (L^* , a^* ve b^*) değişimi üzerine etkisi

Figure 2 The effect of process parameters on the change of colour characteristics (L^* , a^* and b^*) of apple juice samples contaminated with *Z. bailii*



Şekil 3 Proses parametrelerinin *Z. bailii* ile kontamine edilmiş elma suyu örneklerinin biyoaktivite özelliklerinin (TFM: Toplam fenolik madde, AA: Antioksidan aktivite ve ARA: Antiradikal aktivite) değişimi üzerine etkisi
 Figure 3 The effect of process parameters on the change of bioactive properties (TPC: Total phenolic content, AA: Antioxidant activity and ARA: Antiradikal activity) of apple juice samples contaminated with *Z. bailii*

FIC değeri hesaplanırken herhangi bir A ve B antimikrobiyeli için;

$$FIC_A = (MIC_B \text{ 'nin varlığında}) / (MIC_A)$$

$$FIC_B = (MIC_A \text{ 'nin varlığında}) / (MIC_B)$$

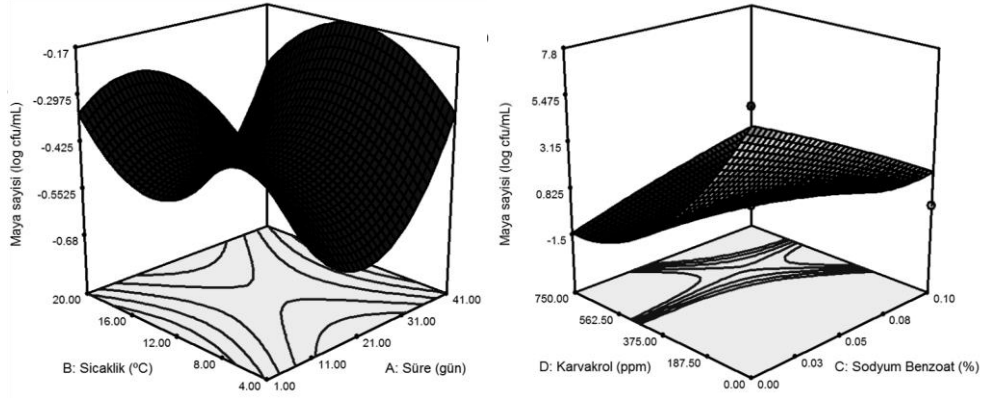
$$FIC_{index} = FIC_A + FIC_B$$

Formülü kullanılmaktadır (Lopez-Malo ve ark. 2007).

FIC_{index} değeri 0.5'ten az veya eşitse antimikrobiyeller arasında sinerji, 1-2 arasında ise ya da 2'den büyükse antimikrobiyeller arasında antagonizm olduğu söylenebilmektedir (Moon ve ark. 2011).

Örneklerin *Z. bailii* sayıları ile çalışılan bazı parametreler arasında önemli korelasyonlar gözlenmiş, bu bağlamda maya sayısı ile briks değeri arasında negatif (r=-

0,917), maya sayısı ile bulanıklık değeri arasında pozitif (r=0,879) korelasyon tespit edilmiştir. Bunun yanında maya sayısı ile renk değerleri ile pozitif, biyoaktif parametreler ile de negatif bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. Shaifi-Rad ve ark. (2018) karvakrolün özellikle kekik uçucu yağında yer alan monoterpeneo yapılı bir fenolik bileşik olduğunu ve klinik uygulamalar açısından çok önemli biyoaktif özellikler sergilediğini ifade etmiş ve karvakrolün diğer uçucu yağ kompozisyonunda yer alan bileşiklerden çok daha kuvvetli bir antimikrobiyal ajan olduğunu bildirmiştir. Karvakrolün kuvvetli antimikrobiyal aktivitesi serbest radikal grubu içermesi, hidrofobitesine ve sahip olduğu fenol halkasına bağlanmıştır (Shaifi-Rad ve ark. 2018).



Şekil 4 Proses parametrelerinin *Z. bailii* ile kontamine edilmiş elma suyu örneklerinin maya sayısı değişimi üzerine etkisi

Figure 4 The effect of the process parameters on the change in yeast number of apple juice samples contaminated with *Z. bailii*

Çizelge 5 Optimizasyon işlemi sonrasında hesaplanan maksimum ve minimum değerler

Table 5 Maximum and minimum responses calculated after optimization

Parametreler [§]	Deneysel faktörler [¶]				Max. Tepki	Min. Tepki	İstenirlik
	A	B	C	D			
pH	40,29	14,10	0,08	328,5	3,69	3,25	1,000
	9,04	5,11	0,00	619			
Brix	31,19	19,19	0,10	626,7	12,88	7,04	1,000
	25,96	19,97	0,00	7,37			
Toplam asitlik (%)	1,34	19,94	0,08	23,87	6,07	5,08	1,000
	26,33	7,61	0,09	115,33			
Bulanıklık (NTU) [¶]	27,76	19,68	0,00	6,43	21,31	1,816	1,000
	1,37	19,43	0,09	342,9			
<i>L</i> *	39,9	16,46	0,01	1,85	17,53	2,34	1,000
	25,10	18,59	0,00	719,9			
<i>a</i> *	39,43	19,45	0,02	8,26	5,59	1,31	1,000
	17,05	4,15	0,09	53,54			
<i>b</i> *	40,59	9,10	0,00	9,75	18,23	2,99	1,000
	18,79	18,26	0,04	738,6			
TFM (mg GAE/L)	40,69	17,95	0,06	664,4	693,7	124,8	1,000
	11,66	8,65	0,00	4,00			
AA (mg AAE/L)	4,30	19,69	0,01	592,1	170,8	27,59	1,000
	41	19,77	0,00	27,6			
ARA (% inh.)	10,14	16,48	0,07	745,3	69,80	56,27	1,000
	39,39	16,33	0,03	5,45			
Z.bailii sayısı (log cfu/ml)	39,20	18,37	0,00	27,94	8,82	0,01	1,000
	31,15	16,14	0,01	664,7			

[¶]Karekök transformasyon uygulanmıştır, A, B, C ve D sırasıyla süre (gün), sıcaklık (°C), sodyum benzoat (%) ve karvakrol (ppm)'ü ifade etmektedir, TFM: Toplam fenolik madde, ARA: Antiradikal aktivite, AA: Antioksidan aktivite

Tahminleyici Denklemler ve Optimizasyon

Tepki yüzey yöntemi uygulaması ile parametrelerin tepkileri üzerine olan etkileri tespit edilmiş ve ANOVA yöntemi ile istatistiksel olarak etkili olan parametreler belirlenmiştir. Daha sonra örneklerin çalışılan ilgili parametrelerinin proses değişkenlerine göre olan değişimi polinomial modeller ile açıklanmaya çalışılmış ve bu bağlamda oluşturulan prediktif regresyon denklemler Çizelge 4'te, verilmiştir. Çizelgeden de görüleceği üzere tüm denklemlerin hemen hemen hepsi için hesaplanan determinasyon katsayısı değerleri denklemin tahminleme gücünün yeterli olduğunu göstermiş ve en düşük 0,69, en yüksek olarak da pH değeri için 0,97 olarak hesaplanmıştır. Oluşturulan tahminleyici denklemlerin deneme deseni orta noktaları için performansları test edilmiş ve elde edilen

determinasyon katsayıları çerçevesinde etkinliklerinin yüksek olduğu görülmüştür. Örneğin pH değeri deneysel olarak 3,44 ölçülmüşken, prediktif olarak orta nokta değerleri için pH 3,45 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde örneklerin toplam fenolik madde miktarları deneysel olarak 339,5 mg GAE/L olarak ölçülmüş, bu değer prediktif olarak 337,7 mg GAE/L olarak hesaplanmıştır. Oluşturulan regresyon denklemleri bağlamında her bir parametrenin alabileceği maksimum ve minimum değerlerin hangi şartlarda oluşacağı Çizelge 5'te gösterilmiştir. Görüldüğü üzere maksimum pH değerinin depolamanın sonuna doğru artış göstereceği belirlenirken minimum pH değeri karvakrol ilavesi ile ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde *Z. bailii* faaliyeti sonucu doğrudan değişen ve maya sayısı ile korelasyon gösteren brix değeri maksimum seviyede ancak karvakrol

varlığı ile tutulabilirken, minimum değeri neredeyse hiç karvakrol içermeyen örnekte tespit edilebileceği öngörülmüştür. Örneklerin renk değerleri benzer sonuçlar göstermiş, karvakrol ilavesinin olduğu durumda minimum değerler tespit edilmiştir. Örneklerin biyoaktif özelliklerinden toplam fenolik madde değerleri karvakrol varlığına bağlı olarak depolamanın sonunda maksimum seviyeye ulaşırken, başlangıçta elma sularına ilave edilen ve depolama süresince hem kalite parametrelerinde oluştuğu değişim hem de doğal bir koruyucu olan karvakrol varlığındaki canlılık oranlarının araştırıldığı *Z.bailii* sayısı depolamanın sonunda yüksek karvakrol miktarına karşı minimum canlılık sergilemiş ve neredeyse tüm faaliyetleri koruyucu varlığında kısıtlanmıştır.

Sonuç

Bu çalışmada elma suyuna doğal bir koruyucu olan karvakrol ilavesinin depolama boyunca elma suyunun bazı fizikokimyasal ve biyoaktif özelliklerinde meydana gelen değişim araştırılmış ve sonuçlar tepki yüzey yöntemi ile modellenmiştir. Depolama süresi boyunca karvakrol içeren elma suyu örneklerinin özellikle pH, briks ve renk değerleri korunurken, karvakrol içermeyen örneklerde *Z. bailii* faaliyeti sonucu şeker moleküllerinin metabolize edilmesiyle briks değerlerinde oldukça önemli bir azalma ve renk özelliklerin de ise arzu edilmeyen değişimler meydana gelmiştir. Karvakrol ilavesi elma suyunda bozulma etmeni olan *Z. bailii* mayasını başarılı bir şekilde inhibe ederek ilave edildiği elma suyunu depolama şartlarına da bağlı olarak muhafaza edebilmiştir. Tepki yüzey yöntemi ile gerçekleştirilen modelleme ile tahminleyici polinomial eşitlikler oluşturulmuş ve bunların etkinlikleri de oldukça yüksek bulunmuştur. Yapılan optimizasyon işlemi sonucunda minimum maya sayısının 664,7 ppm ve %0,01 sodyum benzoat içeren örneğin 16,14°C sıcaklıkta ortalama 32 gün süreyle depolama neticesinde elde edilebileceği, karvakrol miktarının azalmasıyla elma suyu örneğinde bozulma etmeni *Z. bailii* gelişiminin hızlanacağı tespit edilmiştir. Sodyum benzoat kullanılmadan sadece karvakrol ilavesi ile muhafaza edilmek istenmesi durumunda ise 417 ppm karvakrol ilavesi ile 11°C sıcaklıkta ve 20 günlük depolama sonunda maya sayısının en düşük seviyede olduğu görülmüştür. Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında özellikle meyve suyu endüstrisinde doğal muhafaza açısından önem arz edebilecek değerli bulgular elde edilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Kevser Karaman tarafından sunulan yüksek lisans tezinin bir bölümünden alınmış ve maddi olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBY: 09-1005 kodu ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2015. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*. 54: 111-119.

- Cemeroglu B, Acar J. 1986. Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği, Ankara, 56 s.
- Çoban ÖE, Patır B. 2010. Antioksidan Etkili Bazı Bitki ve Baharatların Gıdalarda Kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5 (2):7-19.
- Dorman HJ, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88(2): 308-316.
- FDA. Electronic Code of Federal Regulations (e-CFR). Part 182–Substances Generally Recognized as Safe, Section 182.20–Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates) Title 21, Volume 3, revised as of September 1, 2016b. Available at: http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=13171357fad6c60a18a56777e7898b4&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#se21.3.182_120, 2016. accessed June 15, 2018. Google Scholar.
- Fitzgerald DJ, Stratford M, Narbad A. 2003. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International Journal of Food Microbiology*. 86 (1-2): 113-122.
- Elshafie HS, Armentano MF, Carosino M, Bufo SA, Deo Feo V, Camele I. 2017. Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules*, 22(9):1435.
- European Commission. 1999. Commission decision of 23 February 1999 adopting a register of flavouring substances used in or on foodstuffs drawn up in application of regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council on 28 October 1996. 1999/217/EC. Official J 27:L084:1–137. Google Scholar
- Evans DG, Everis LK, Betts GD. 2004. Use of survival analysis and classification and regression trees to model the growth/no growth boundary of spoilage yeasts as affected by alcohol, ph, sucrose, sorbate and temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 92: 55-67.
- Gao J, Rupasinghe HPV. 2012. Nutritional, physicochemical and microbial quality of ultrasound-treated apple-carrot juice blends. *Food and Nutrition Sciences*. 3: 212-218.
- Gürsoy OV, Gürsoy DUK. 2004. Anadoluda dis ve dis eti hastalıkları ile ilgili hastalıkların tedavisinde halk arasında yaygın olarak kullanılan bitkiler, kullanım şekilleri ve bitkisel özellikleri. *Dis Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 7(1): 64-67.
- Klimczak I, Małacka M, Szlachta M, Gliszczynska-Swięto A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20: 313-322.
- Kusumegi K, Yoshida H, Tomiyama S. 1998. Inhibitory effects of acetic acid on respiration and growth of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85(2): 213-217.
- Leandro MJ, Sychrova H, Prista C, Loureiro-Dias MC. 2011. The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiology*. 157: 601-608.
- Lopez-Malo A, Barreto-Valdivieso J, Palou E, Martín FS. 2007. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. *Food Control*. 18(11): 1358-1362.
- Martorell P, Stratford M, Steels H, Fernández-Espinar MT, Querol A. 2007. Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology*. 114(2): 234-242.
- Memar MY, Raei P, Alizadeh N, Aghdam MA, Kafil HS. 2017. Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates. *Reviews in Medical Microbiology*. 28: 63–68
- Moon SE, Kim HY, Cha JD. 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology*. 56(9): 907-916.

- Oussalah M, Caillet S, Salmiéri S, Saucier L, Lacroix M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 5598-5605.
- Palou E, López-Malo A, Barbosa-Canovas G, Welti-Chanes J, Swanson B. 1997. Effect of water activity on high hydrostatic pressure inhibition of *Zygosaccharomyces bailii*. *Letters in Applied Microbiology*. 24(5): 417-420.
- Praphailong W, Fleet G. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*. 14(5): 459-468.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269(2): 337-341.
- Raso J, Calderón ML, Góngora M, Barbosa Cánovas GV, Swanson BG. 1998. Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices by heat, high hydrostatic pressure and pulsed electric fields. *Journal of Food Science*. 63(6): 1042-1044.
- Sagdıç O, Ozturk I, Ozkan G, Yetim H, Ekici L, Yılmaz MT. 2010. RPHPLC- DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chemistry*. 126(4): 1749-1758.
- Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, del Mar Contreras M, Sharifi-Rad J. 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*. 32(9): 1675-1687.
- Sun X, Narciso J, Wang Z, Ference C, Bai J, Zhou K. 2014. Effects of chitosan-essential oil coatings on safety and quality of fresh blueberries. *Journal of Food Science*. 79(5): M955-M960.
- Tezcan F, Gültekin-Özgüven M, Diken T, Özçelik B, Erim FB. 2009. Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. *Food Chemistry*. 115(3): 873-877.
- Tokuoka K. 1993. A review: sugar and salt tolerant yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*. 74: 101-110.
- Tournas V, Heeres J, Burgess L. 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*. 23(7): 684-688.
- Yılmaz MT. 2002. Nitrit, glukonodeltalakton ve askorbik asidin sucugun bazı özellikleri üzerine etkisinin yanıt yüzeyi yöntemi ile modellenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Van, 41 s.*